

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und  
Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt  
Der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. D. Klenk  
Institut für Immunologie  
Leiter: Prof. Dr. D. Gemsa

**Die immunmodulierende Wirkung von  
Trinitrotoluol und seiner Metaboliten auf  
die Funktion von menschlichen Monozyten.**

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Stephan Reinhard Scheffer  
aus Marburg

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am  
23.01.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich

Dekan: Prof.Dr.med.Maisch

Referent: Prof.Dr.med.Gemsa

Koreferent: PD.Dr.med.Herz

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
Rüstungsmittelstandorte	9
Grundwassergefährdung	9
Heutige Flächennutzung – Umgang mit Liegenschaften	11
Chemische Verwandtheit – ähnliche Toxizität?	12
Krankenberichte – klinische Bilder	12
Das Immunsystem	17
Monozyten/ Makrophagen	17
Morphologie von Monozyten	18
Zytotoxische Mechanismen von Monozyten	18
Enzymreaktionen zur Herstellung sauerstoffabhängiger Radikale	19
Enzymreaktionen zum Abbau von $H_2O_2$	19
Natürliche Chemilumineszenz	19
<b>Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
Zellen	23
Primäre Zellen	23
Zelllinie	23
Standardbedingungen im Umgang mit Zellkulturen	24
Limulus – Amöbocyten – Lysat – Test	24
Zellzahlbestimmung	24
Überprüfung der Zellvitalität	24
Mikroskopie	24
Trypanblau – Färbetest	25
Bestimmung der Stoffwechselaktivität	25
MTT – Test	25

EZ4U – Test	25
Metabolisierung von TNT durch Monozyten	26
Isolierung und Anreicherung primärer humaner Monozyten	26
Ficoll – Hypaque – Dichtezentrifugation	27
Elutriation	27
Reinheit der durch Elutriation gewonnenen Monozyten	29
Eingesetzte Nitroaromate	29
Stimulation mit Zymosan	29
Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	30
Chemilumineszenz	30

## **Experimente und Ergebnisse 33**

Bestimmung der Vitalität mit der Trypanblau – Färbung	33
Vitalitätsbestimmung mit dem nichtradioaktivn EZ4U–Test	36
Gemeinsame Bewertung von Trypanblau-Färbung und EZ4U Test über die Toxizität von Trinitrotoluol (TNT) auf menschliche Monozyten/ Makrophagen	38
Untersuchung der Metabolisierung von Trinitrotoluol (TNT) durch die menschliche Monozytenzelllinie Mono Mac 6	39
Der Einfluss von Nitroaromaten auf die Reaktionsfähigkeit von primären menschlichen Monozyten gegen Candida albicans	43

## **Diskussion 53**

Toxizität von TNT auf menschliche Monozyten	55
Metabolisierung von TNT durch menschliche Monozyten	57
Die Chemilumineszenz von primären humanen Monozyten unter dem Einfluss von TNT und anderen Nitroaromaten	58

## **Zusammenfassung 62**

## **Literaturverzeichnis 66**

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
<sup>14</sup> C	Kohlenstoffisotop
<sup>15</sup> N	Stickstoffisotop
2,4-DNT	2,4-Diamino-6-Nitrotoluol
2-ADNT	2-Amino-4,6-Dinitrotoluol
4-ADNT	4-Amino-2,6-Dinitrotoluol
2A-4,6-DNT	2-Acetylamino-4,6-Dinitrotoluol
4A-2,6-DNT	4-Acetylamino-2,6-Dinitrotoluol
CAS	Chemical abstract service number
CHO	Chinesische Hamsterovarienzellen
ED <sub>50</sub>	Effektive Dosis für 50% der Zellen
EZ4U	Easy for You, Produktname
FCS	Fötales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
H4IIE	Ratten Hepatomzelllinie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis für 50% der Zellen
m	milli
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
min	Minute(n)
moto	Monatstonnen (oder auch Tonnen pro Monat)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromid
NOEL	no observable effect level (Schwelle, bei der noch keine Effekte bemerkt werden)
PBS <sup>def</sup>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Magnesium, ohne Kalzium
RPMI <sup>supp</sup>	RPMI-Medium mit Kulturzusätzen (Standardmedium)

TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
TRD	Technische Regel für Dampfdruck

## Einleitung

In den 80er und 90er Jahren verstärkte sich das Interesse und Bewußtsein im Rahmen der „allgemeinen Umweltbewegung“, sich mit Hinterlassenschaften der Sprengstoffindustrie des 1. und 2. Weltkrieges intensiver zu befassen. Nachdem durch umfangreiche Untersuchungen die ehemaligen militärischen Standorte und Produktionsstätten lokalisiert waren, wurde die Bedeutung und Gefährdung für den Menschen und die Umwelt augenscheinlich. Parallel zur Erfassung und Gefahrenabschätzung wurden Sanierungskonzepte überregional, teilweise weltweit konzipiert und erprobt. An der Philipps-Universität Marburg gibt es ein besonderes Interesse, dieses Thema intensiv zu untersuchen. In unmittelbarer Nähe, nämlich in Stadtlenddorf, liegt Europas größte Sprengstoffindustrieanlage des 2. Weltkrieges mit 9 km<sup>2</sup> Gesamtnutzungsfläche. Verschiedene Fachbereiche der Universität haben sich fachspezifischer, aber auch übergreifender Aufgabenstellungen angenommen; beispielhaft seien die Biologie, Chemie, Geographie und nicht zuletzt die Umwelthygiene und Humanmedizin genannt. Aus diesen spannenden Untersuchungen kristallisierte sich die Fragestellung heraus, welche Wirkung Trinitrotoluol (TNT) als Hauptprodukt und mengenmäßig größter Sprengstoffrückstand im Boden auf das Immunsystem des Menschen haben könnte. Da das humane Immunsystem selbst noch intensiv in den grundsätzlichen Funktionen erforscht wird, entschieden wir uns, eine Zellgruppe mit besonderer Stellung und besonderen Fähigkeiten repräsentativ herauszugreifen. Die Monozyten und Makrophagen haben als besondere Fähigkeit die gezielte Aufnahme und Präsentation von Substanzen. Sie stehen zwischen unspezifischer und spezifischer Abwehr des Immunsystems.

Bisher sind keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen über die Wirkung von Sprengstoffrückständen auf das humane Immunsystem am Beispiel von TNT und seinen Metaboliten bekannt. Diese Arbeit soll erstmals die toxische Grenze für humane Monozyten/ Makrophagen ermitteln, anschließend die Frage beantworten, ob TNT von Monozyten/ Makrophagen metabolisiert werden kann und wenn ja, zu welchen Abbau-Produkten. Im letzten Teil soll untersucht werden, ob TNT und typische TNT-Metabolite einen Einfluss auf die Phagozytose und Reaktionsfähigkeit von Monozyten/ Makrophagen haben.

Zuerst möchte ich in den folgenden Abschnitten die Bedeutung von TNT für die Umwelt und die Gesundheit vorstellen. Trinitrotoluol und seine Metabolite gehören seit ihrer Erfindung

1863 durch J. Wilbrand und der weitreichenden Anwendung als Sprengstoff in den beiden Weltkriegen zu den mengenmäßig größten Rüstungsmittelaltlasten in der gesamten industriellen Welt (Wolff, H.J. 1998). Zu den Rüstungsmitteln im erweiterten Sinne gehören die Pulver-, Sprengstoff-, Kampf- und Nebelstoffproduktion. Trinitrotoluol stellte den Hauptrepräsentanten der Sprengstoffproduktion dar und findet sich praktisch an jedem Produktions- und Abfüllort für Sprengstoffe oder an Orten langer und intensiver Anwendung. Wie Haas mehrfach zeigen konnte, ist TNT als häufigster und typischer Vertreter auf Produktionsanlagen als Markersubstanz sehr gut zur Erkennung von Bodenkontaminationen auf ehemaligen Rüstungsstandorten geeignet (Haas, R. 1992), (Haas, R., et al 1990). Anfang der 80er Jahre machten sich Preuss und Haas erstmals daran, alle Standorte der Rüstungsmittelproduktion auf dem Gebiet des ehemaligen Deutschen Reichs zu erfassen. 340 Orte, von denen 60 der industriellen Trinitrotoluolproduktion und -abfüllung zugerechnet werden können (Preuss J. und Haas, R. 1987), wurden ermittelt. Geologisch-geographische Standortuntersuchungen weisen neben der unmittelbaren Bodenkontamination auf die Gefahr großflächiger und schwerwiegender Grundwasserbelastungen hin (Haas R. und v. Löw E.). TNT löst sich teilweise in Wasser und kann leider auch im Grundwasser, Boden und in Pflanzenbestandteilen nachgewiesen werden (Görge E., et al 1994). Die akute toxikologische Bewertung von Trinitrotoluol und seinen Metaboliten auf den Menschen beschränkt sich heute im allgemeinen auf den Umgang mit dieser Substanz am Arbeitsplatz oder die Bewertung von Arbeitsunfällen mit kurzfristigen erheblichen Substanzfreisetzungen. Für diesen Zweck werden regelmäßig maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK-Werte) für den Umgang mit Chemikalien veröffentlicht. In der aktuellen MAK-Liste wird bei Trinitrotoluol und seinen Metaboliten neben der Inhalation auf die besondere Bedeutung der Intoxikationmöglichkeit über die Haut hingewiesen (Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, 1993). Am Arbeitsplatz lassen sich viele Gefährdungsfaktoren definieren und Schutzmaßnahmen für die Beschäftigten ergreifen. Im privaten Bereich sind Umfeld und Verhalten der Menschen sehr verschieden und nur wenige gemeinsame Faktoren beschreibbar. Die Möglichkeit von Xenobiotika (Fremdstoffen) in die Nahrungskette zu gelangen, stellt besonders hohe Anforderungen an Vermeidung und Höchstgrenzen im Trinkwasser und in Nahrungsmitteln. Über die kumulative Beeinflussung des menschlichen Organismus durch TNT in nicht akut toxischer Dosis gibt es kaum Untersuchungen.



### **Rüstungsmittelstandorte**

Die erste Erfassung der Rüstungsmittelbetriebe erfolgte im 2. Weltkrieg im Rahmen der Zielerfassung durch alliierte Luftaufklärung. Die Aufnahmen aus der Zeit des zweiten Weltkriegs sind auch heute noch wichtige Hilfsmittel, da die ehemaligen Produktionsstätten teilweise durch anschließende Nutzungen oder Demontage deutlich umstrukturiert wurden (*Bick, H. und Preuss, J. 1991*). Die Erfassung der Standorte der Rüstungsindustrie im ehemaligen Deutschen Reich, mit Angaben über die räumliche Verteilung, Art und Menge der dort produzierten Substanzen, gelang erstmals im Jahre 1987 Preuss und Haas (*Preuss, J. und Haas, R. 1987*). 348 Werke konnten ausgemacht werden, die zur Pulver-, Sprengstoff-, Kampf- und Nebelstoffproduktion oder ihrer Vor- und Folgeprodukte gehörten. In 16 Werken wurde als wichtigster militärischer Sprengstoff 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) produziert (*Bruns-Nagel, D. 1997*). 61 Standorte dienten der Abfüllung von Bomben und Granaten (*Bick, H. und Preuss, J. 1991*). Bick und Preuss weisen auf den enormen Flächenbedarf der Sprengstoffindustrie hin, die für die Produktion von TNT im Mittel  $2,6 \times 1,6 \text{ km}^2$  und für Abfüllstationen im Mittel  $0,9 \times 0,5 \text{ km}^2$  beanspruchte. Häufig waren beide Produktionsabläufe auf einem Gelände angesiedelt und die Gebäude mit Erdwällen umgeben. Stadtallendorf (Hessen) als größtes Sprengstoffwerk im 2. Weltkrieg umfasste eine Gesamtfläche von fast  $9,0 \text{ km}^2$  (*Bick, H. und Preuss, J. 1991*). Die Gesamtkapazität für militärische Sprengstoffe lag 1945 im ehemals Deutschen Reich bei 32000 moto (Tonnen pro Monat), wobei TNT den wesentlichen Teil mit 23600 moto darstellte (*Preuss, J. und Haas, R. 1987*). Die größten Produktionskapazitäten hatten Stadtallendorf (5400 moto), Hessisch-Lichtenau (3750 moto), Krümmel (2950 moto), Elsing (2950 moto) und Clausthal-Zellerfeld (2800 moto).

### **Grundwassergefährdung**

Die Produktion von TNT als Sprengstoff im großtechnischen Maßstab benötigt große Mengen an Wasser. Da die Planung und Erschließung der Werke in den 30er und 40er Jahren auf sehr große Produktionsmengen abzielten, wurden große natürliche Wasservorkommen erkundet und erschlossen (*Preuss, J. und Haas, R. 1987*). Die TNT-Produktion der Kriegsjahre in Stadtallendorf hat beispielsweise ca. 31 Mio.  $\text{m}^3$  Abwässer verursacht, ferner Abfallhalden mit einem Volumen von  $45000 \text{ m}^3$ . Für die Produktion einer Tonne TNT benötigte man 260-300  $\text{m}^3$  Wasser, davon ist ein Großteil Kühlwasser (85-87,5 %) und 12,5-15 % Abwasser, das

mit Ätzkalk neutralisiert wurde. Der Kalk mit einem Wassergehalt von 60-70 % wurde deponiert (*Preuss, J. et al 1988*).

*Für Europas größten Produktionsstandort im 2. Weltkrieg (Stadtallendorf) gilt:*

<i>Gesamtproduktion</i>	<i>125000 Tonnen TNT</i>
<i>Gesamtwasserverbrauch</i>	<i>32,5-37,5 Mio. m<sup>3</sup></i>
<i>belastetes Abwasser</i>	<i>4-5 Mio. m<sup>3</sup></i>
<i>benötigter Ätzkalk</i>	<i>22000 Tonnen</i>
<i>Deponievolumen</i>	<i>40-50000 m<sup>3</sup></i>

***Tabelle 0-1***

Die meisten Deponien liegen auf dem Produktionsgelände und sind bei fehlender Abdeckung der Witterung direkt ausgesetzt. Insbesondere Regen wäscht Nitroaromate wie TNT und seine Metaboliten aus dem Boden und trägt durch das Sickerwasser zur Gefährdung tieferer Grundwasserschichten bei. Die heutige Nutzung zur Trinkwassergewinnung damals erschlossener Brunnen ist nicht ohne Probleme und bedarf regelmäßiger Kontrolle. In einigen heute nicht mehr genutzten Brunnen konnten Haas und von Löw 1986, in besonderem Maße nach Bodenbewegungen, Nitroaromate feststellen (*Haas, R., v. Löw, E. 1986*). Das Einzugsgebiet des Grundwassers für die 33 Brunnen in Stadtallendorf wird mit etwa 150 km<sup>2</sup> angenommen (*Preuss, J. et al. 1988*). Etwa 10 Millionen m<sup>3</sup> Trinkwasser werden pro Jahr aus diesem wichtigen Grundwasserspeicher für 250000 Menschen im mittelhessischen Raum gefördert. Prof. Dieter hat in diesem Zusammenhang Richtwerte im Umgang mit Trinkwasser und der Wassernutzung im durch Nitroaromaten gefährdeten Bereich empfohlen. Die Tabelle 0-2 stellt beispielhaft die Empfehlung für TNT und einige Metabolite vor (*Dieter, H. H. 1994*). Bei Mischkontamination durch Nitroaromate im Trinkwasser gibt Dieter einen Vorsorgesummenwert von 0,5 µg/l an, als toxischen Summenwert 10,0 µg/l (bei Vorhandensein von 2,6-Dinitrotoluol, 2-Nitrotoluol oder 2,4-Dinitrotoluol soll die Gesamtsumme an Nitroaromaten 0,5 µg/l nicht überschreiten).

## Toxikologische Bewertung von sprengstofftypischen Schadstoffen im Trinkwasser

(Dieter, H. H. 1994):

(Die Tabelle 0-2 zeigt nur einen Ausschnitt einer umfangreichen Nitroaromatenliste.)

<i>Stoff</i>	<i>Vorsorge</i>	<i>toxikologisch</i>
2,4,6-TNT <sup>a</sup>	0,1 µg/l	1,0 µg/l
4-Amino-2,6-dinitrotoluol <sup>b</sup>	0,1 µg/l	-
2-Amino-4,6-dinitrotoluol <sup>b</sup>	0,1 µg/l	-

<sup>a</sup> toxikologische Bewertung anhand chronischer Tierversuche

<sup>b</sup> nicht oder nur anhand von Daten zur Genotoxizität bewertbare Stoffe

*Tabelle 0-2*

## Heutige Flächennutzung – Umgang mit Liegenschaften

Die Verwendung ehemaliger Sprengstoffproduktionsstandorte ist ausgesprochen vielfältig. Einige Standorte werden durch alliierte oder bundesdeutsche Militäreinheiten genutzt, teilweise sind die Gelände auch schon seit Jahrzehnten als Gewerbe- oder Siedlungsanlagen erschlossen. Neben der Frage nach Sanierungspflicht und Sanierungskosten steht immer wieder die Frage der möglichen gesundheitlichen Risiken im Raum. Wie Wolff feststellte, ist die Altlastensanierung von ehemaligen Rüstungsanlagen ein weltweites Problem, begründet in der häufig unsachgemäßen Stilllegung oder Demontage der Explosivstoffindustriebetriebe in früheren Jahrzehnten (Wolff, H. J. 1998). Die späte Einsicht von Wirtschaft, Politik und Bevölkerung (nach mehr als 50 Jahren), dass es zur Erhaltung von Lebensraum der Sanierung bedarf, zeigt erste Erfolge – nicht zuletzt in der Festlegung von Finanzierungsfragen und Zuständigkeiten. Die eindeutige Klärung der Zuständigkeiten im juristischen Sinne sind es aber, die den Willen und die Möglichkeiten zur erfolgreichen Sanierung beschreiben. Wie so häufig die Frage: Was wollen, was können wir uns leisten, und was ist es uns wert (von Knopp, L. 1996) ?

### **Chemische Verwandtheit – ähnliche Toxizität?**

Es gibt verschiedene Methoden, Substanzen auf ihre Gefährlichkeit abzuschätzen. Eine Möglichkeit ist der Gedankenschluss über die chemische Verwandtschaft der Einzelsubstanzen, wobei immer eine relativ große Restunsicherheit bestehen bleibt. 2,4,6-Trinitrotoluol wurde erstmals 1863 von J. Wilbrand in unreiner Form, dann 1880 von P. Hepp in reiner Form synthetisiert (*Martinetz, D., Rippen, G. 1996*). Die Synthese erfolgt durch schrittweise Nitrierung von Toluol. TNT bildet als Reinsubstanz schwach gelbliche Kristalle. Es wird unter der Chemical Abstracts Service Nummer (CAS) 118-96-7 geführt und hat die Summenformel  $C_7H_5N_3O_6$ . Die Wasserlöslichkeit bei 20 °C beträgt 130 mg/l; TNT unterliegt in Oberflächenwasser stark der Photolyse und hat bei flachen Gewässern eine Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten, in Meerwasser mit einem pH-Wert von 8 lag TNT nach 108 Tagen unverändert vor (*Martinetz, D., Rippen, G. 1996*). Der Schmelzpunkt liegt bei 80,35 °C; bei einer Temperatur von 81-285 °C kommt es zur Zersetzung. Die Zündtemperatur für TNT ist 240 °C, bei 300 °C kommt es zur Verpuffung (die chemisch-physikalischen Daten wurden freundlicherweise von Dr. Schiele, Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, zur Verfügung gestellt). Die deutsche Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe hat TNT durch seine chemische Nähe zu 2,4-DNT und 2,6-DNT unter die Stoffe mit begründetem Verdacht auf Krebserzeugung eingestuft. Das entspricht der Stufe MAK IIIB (maximale Arbeitsplatzkonzentration), mit dem zusätzlichen Hinweis der Gefährdung durch Hautresorption von 2,6-3,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in 8 Stunden (*Henschler, 1988*), (*Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, 1993*).

### **Krankenberichte - klinische Bilder**

Historische Krankenberichte zeigen den dramatischen Erfahrungsgewinn und Veränderungen im Umgang mit TNT. TNT wurde lange Zeit für ungiftig gehalten, bis es jedoch zwischen 1911 und 1915 zu 279 Todesfällen unter Munitionsarbeitern kam, die auf TNT-Intoxikationen zurückzuführen waren. Genaue Messungen aus dieser Zeit liegen nicht vor, aber Schätzungen nehmen 25 mg TNT als tägliche Aufnahme über die Haut und Atemwege beim Arbeiten mit TNT an (*Neumann 1989*). Heute sind solche massiven Intoxikationen nicht zu erwarten, aber auch geringere Mengen zeigen deutliche Wirkungen auf die Gesundheit und das Wohlbefinden des Menschen.

**Beobachtungen an mehr als 1800 Personen ergaben folgende Symptomzusammenstellung (Neumann 1989)**

- Irritierende Symptome:

**Atemtrakt:** Nasenbluten, Nasenlaufen, Augenbrennen, Kopfschmerzen, Engegefühl in der Brust, trockener Husten

**Verdauungstrakt:** bitterer Geschmack im Mund, gesteigerter oder verminderter Appetit, Brechreiz, Erbrechen, Bauchschmerzen, Verstopfung, später Durchfall

**Haut:** Dermatitis an den Berührungsflächen, juckender Ausschlag, Quaddeln, Bläschen, Gelbfärbung der Haut an Händen, Füßen und Gesicht

- Toxische Symptome:

**Verdauungstrakt:** Anorexie, Gallenkoliken, Gastritis, Oberbauchbeschwerden, toxische Gelbsucht

**Blut:** Methämoglobinbildung, Blässe, Zyanose, Lufthunger, Anämie, aplastische Anämie, Veränderung des Blutbildes, subkutane Blutungen

**Kreislauf:** Bradykardie, Herzklopfen, Anschwellen von Händen und Füßen

**Nervensystem:** Benommenheit, Apathie, Depression

**andere:** irreguläre, schwache Menstruation, dunkler Urin, verstärktes Schwitzen

Die individuelle Empfindlichkeit gegenüber TNT ist sehr unterschiedlich. Neumann führt das auf den genetischen Polymorphismus von Stoffwechselenzymen zurück, was insbesondere bei Medikamenten sehr gut untersucht ist. Die meisten der angegebenen Symptome lassen sich auch im Tierversuch bei verschiedenen Tierarten reproduzieren. Betroffene Organe waren: Leber, Milz, Hoden und Blut (Neumann 1989). In einer Zusammenstellung der Stoffwechselenzyme zur Biotransformation von Nitroaromaten kommt Koss (Koss *et al.* 1989) auf eine Anzahl von mehr als zehn verschiedener möglicher Enzyme mit reduzierender, acetylierender oder oxidierender Wirkung. Weitere Untersuchungen zu den gesundheitlichen Folgen einer TNT-Belastung am Arbeitsplatz kommen aus China. Liu (Liu, Y. Y., *et al.* 1995) zeigt die Ab-

hängigkeit einer zunehmenden Kataraktbildung („TNT-Star“) bei einer steigenden Belastung durch TNT, da TNT mit einigen Proteinen kovalente Bindungen eingehen könne und die Proteinneusynthese in der Linse langsamer vonstatten geht als in anderen Organsystemen. Kumagai et al. (*Kumagai, Y. et al. 2000*) zeigen an Rinderaugen, dass bei der Reduktion von TNT durch das Enzym Zeta-crystallin reaktiver Sauerstoff als Reaktionsprodukt entsteht, der durch fehlende schützende Enzyme im Linsenbereich möglicherweise im Zusammenhang mit dem „TNT-Star“ stehen könnte. Eine andere Arbeit zeigt die veränderte Zusammensetzung und Physiologie des Ejakulats von Arbeitern aus der Munitionsproduktion (*Liu, H. X. et al. 1995*). In der TNT belasteten Gruppe konnten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermehrt abnorme Spermien beobachtet werden, sowie eine verlängerte Verflüssigungszeit des Ejakulats. Bei Befragungen gaben die TNT-Arbeiter eine verminderte Libido an. Wichtig zu bemerken ist, dass die dargestellten Beobachtungen aus dem Fertigungsprozess stammen und nicht durch Altlasten verursacht sind. Am Arbeitsplatz ist es in Deutschland üblich, maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK) oder technische Richtkonstanten für Chemikalien und andere Gefahrstoffe festzulegen. Die MAK für TNT liegt bei  $0,1 \text{ mg/m}^3$ , Bewertung IIIB (Verdacht auf ein kanzerogenes Risiko) mit der besonderen Betonung der Hautresorption. Auf die Notwendigkeit der differenzierten Betrachtung von Produktionsbedingungen und Altlastenstandort weist auch Prof. Neumann hin. Man solle das Augenmerk nicht so sehr auf die Höhe der Grenzwerte legen, sondern im Sinne der klassischen Hygiene bei unbekannten oder unüberschaubaren möglichen Gefahren durch Altlasten die maximale Reduktion bzw. Sanierung anstreben. Die Vielfalt der Substanzen, die auf Altlastenstandorten in die Tausende gehen können, machen eine toxikologische Beurteilung fast unmöglich. Über den Synergismus der heterogenen Stoffgemische ist für den Menschen bis heute nichts bekannt, die Argumentation aus den Erkenntnissen über Einzelsubstanzen aber üblich (*Neumann, H.- G. 1996*). In der folgenden tabellarischen Zusammenstellung toxikologischer Daten aus der Literatur soll ein Überblick über die sehr unterschiedlichen Dosisintervalle auf Pflanzen und Tiere gegeben werden.

## Toxikologische Bewertung von TNT und seinen Metaboliten

### Zusammenstellung von Literaturangaben

<b>Trinitrotoluol (TNT)</b>				
Effekt	Dosis	Beobachtungs- dauer	Organismus	Literaturquelle
$LD_{50}$	4 µg/ml	24 Stunden	H4IIE	Honeycutt, M. E. et al 1996
$LD_{50}$	24 µg/ml	24 Stunden	CHO	
$LC_{50}$	0,8 mg/l	96 Stunden	Onchorhynchus mykiss	Martinetz, D. & Rippen, G. 1996
$LC_{50}$	2,7 mg/l	96 Stunden	Lepomis macrochirus	
$LC_{50}$	3 mg/l	96 Stunden	Pimephales promelas	
$LC_{50}$	5,2 mg/l	48 Stunden	Lumbricus variegatus	
$LC_{50}$	11,7 mg/l	48 Stunden	Daphnia magna	
LD	14-28 mg/kgKG	Keine Angabe	Mensch	
$LD_{50}$	660 mg/kgKG	Keine Angabe	Maus	Martinetz, D. & Rippen, G. 1996
$LD_{50}$	795 mg/kgKG	Keine Angabe	Ratte	Martinetz, D. & Rippen, G. 1996
$EC_{50}$	3,59 mg/l	30 Minuten	Vibrio fischeri	Drzyzga, O. et al 1994
$EC_{50}$	2,31 mg/l	60 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	2,39 mg/l	90 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	11,9 mg/l	48 Stunden	Daphnia magna	
$EC_0$	1,6 mg/l	7 Tage	Scenedesmus quadricauda	Martinetz, D. & Rippen, G. 1996
$EC_0$	0,32 mg/l	7 Tage	Microcystis aeruginosa	
$EC_0$	>100 mg/l	16 Stunden	Pseudomonas putida	
NOEL	1,4 mg/(kgKG*d)	4 Wochen	Ratte	
$TRD_k$	10 µg/(kgKG*d)	kurzfristig	Mensch	Martinetz, D. & Rippen, G. 1996
$TRD_l$	0,33 µg/kgKG*d)	langfristig	Mensch	

### 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol (2-A-4,6-DNT)

Effekt	Dosis	Beobachtungsdauer	Organismus	Autor
$LC_{50}$	18 µg/ml	24 Stunden	H4IIE	Honeycutt, M.
$LC_{50}$	>250 µg/ml	24 Stunden	CHO	E. et al 1996
$EC_{50}$	>75 mg/l	30 Minuten	Vibrio fischeri	Drzyzga, O. et al 1994
$EC_{50}$	>75 mg/l	60 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	>75 mg/l	90 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	4,5 mg/l	48 Stunden	Daphnia magna	

### 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol (4-A-2,6-DNT)

Effekt	Dosis	Beobachtungsdauer	Organismus	Autor
$LC_{50}$	66 µg/ml	24 Stunden	H4IIE	Honeycutt, M.
$LC_{50}$	>250 µg/ml	24 Stunden	CHO	E. et al 1996
$EC_{50}$	21,17 mg/l	30 Minuten	Vibrio fischeri	Drzyzga, O. et al 1994
$EC_{50}$	16,55 mg/l	60 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	16,18 mg/l	90 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	5,2 mg/l	48 Stunden	Daphnia magna	

### 2,4-Diamino-6-Nitrotoluol (2,4-DA-6-NT)

Effekt	Dosis	Beobachtungsdauer	Organismus	Autor
$LC_{50}$	>250 µg/ml	24 Stunden	H4IIE	Honeycutt, M.
$LC_{50}$	>250 µg/ml	24 Stunden	CHO	E. et al 1996
$EC_{50}$	47,99 mg/l	30 Minuten	Vibrio fischeri	Drzyzga, O. et al 1994
$EC_{50}$	72,99 mg/l	60 Minuten	Vibrio fischeri	
$EC_{50}$	>75 mg/l	90 Minuten	Vibrio fischeri	



## **Das Immunsystem**

Nach dem Überblick über historische und aktuelle Probleme im Umgang mit TNT möchte ich jetzt das Immunsystem mit besonderem Augenmerk auf die Monozyten/ Makrophagen vorstellen. Das menschliche Immunsystem besteht aus etwa einer Billion Zellen, die vorrangig im Blut, in der Lymphe, in lymphoiden Organen, aber vereinzelt in fast jedem Organ zu finden sind. Das Immunsystem spielt die entscheidende Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern und ist essentiell beteiligt an Allergien, Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen. Es gibt verschiedene Versuche, das Immunsystem einzuteilen. Eine Möglichkeit ist die Unterscheidung in ein unspezifisches und ein spezifisches System. Das spezifische System wird durch die Lymphozyten repräsentiert und lässt sich in ein humorales (B-Zellen) und ein zelluläres System (T-Zellen) unterteilen, die sich in wesentlichen Funktionen ergänzen. Zum unspezifischen System gehören Phagozyten (Granulozyten, Monozyten/Makrophagen), Natürliche Killerzellen, aber auch lösliche Faktoren wie Lysozym, Komplementfaktoren oder Akut-Phase-Proteine. Das unspezifische Abwehrsystem ist besonders beim Erstkontakt mit fremden Antigenen gefordert, das spezifische Abwehrsystem beim Wiederholungskontakt oder in der späteren Phase nach Antigenerkennung.

## **Monozyten/ Makrophagen**

Die von Monozyten abstammenden Zellen werden als mononukläres Phagozytensystem (MPS) zusammengefasst (*van Furth, R. 1982*). Die Makrophagen der verschiedenen Organe haben meist organspezifische Namen, wie z.B. in der Lunge Alveolarmakrophagen, im Knochen Osteoklasten, im ZNS Mikroglia und in der Leber Kupffersche Sternzellen. Die Zellen des MPS haben die besondere Fähigkeit, nach Phagozytose Antigene den Zellen des spezifischen Immunsystems zu präsentieren. Die Wirkungen des Immunsystems nach Antigenpräsentation können von Toleranz über lokale Reaktionen bis zur generellen Reaktion auf den Gesamtorganismus reichen. Typische Reaktionsbeispiele sind die Abgabe von  $H_2O_2$  gegen einzelne Bakterien mit direkter Bakterienlyse, die Abgabe von Chemokinen, die verschiedene Immunzellen anlocken, die Bildung von lokalen Entzündungsherden, oder die Freisetzung von  $TNF_\infty$  mit Einfluss auf die Körpertemperatur (Roche Lexikon Medizin, CD-Version 3.5).

## ***Morphologie von Monozyten***

Der Monozyt ist die größte Zelle des Blutes und hat einen Durchmesser von 10-15µm. Er hat eine unregelmäßige Zellbegrenzung, Vakuolen und meist einen ovalen Kern. Werden Monozyten aus dem Blut isoliert und in ein Kulturgefäß gegeben, adhärieren sie und breiten sich über die Oberfläche aus. Ein erwachsener Mensch hat etwa  $1,7 \times 10^9$  Monozyten im Blut, das entspricht etwa 2-8 % aller Blutleukozyten (*Junqueira, L. C.* 1986). Monozyten sind keine Vorläuferzellen, sondern können bereits gut phagozytieren, zytotoxische Aktivitäten entfalten und Mediatoren abgeben (*Gemsa, D.* 1997).

## ***Zytotoxische Mechanismen von Monozyten***

Es lassen sich bei Monozyten drei prinzipielle Mechanismen (*Gemsa, D.* 1997) in der Infektabwehr unterscheiden:

1. lysosomenabhängig
2. sauerstoffabhängig
3. stickstoffabhängig

zu 1. Makrophagen speichern große Mengen an reaktiven Granula in Lysosomen. In diesen findet man beispielsweise Hydrolasen, Lysozym, Myeloperoxidasen und Lactoferrin. Nach der Aufnahme verschmelzen die Lysosomen mit den Antigen enthaltenden Phagosomen und bilden Phagolysosomen.

zu 2. Makrophagen produzieren sauerstoffabhängige Radikale, die in die Umgebung abgegeben werden und eine starke antimikrobielle Wirkung haben.

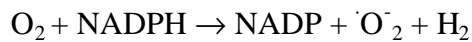
zu 3. Die Bildung reaktiver Stickstoffe durch Makrophagen ist bei der Maus gut untersucht, beim Menschen noch umstritten.

Zu 2.:

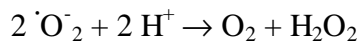
Das funktionelle Testsystem im dritten Abschnitt überprüft die Funktion der Sauerstoffradikalbildung nach einem Standardreiz, daher möchte ich hier die theoretischen Reaktionsabläufe kurz vorstellen.

### Enzymreaktionen zur Herstellung sauerstoffabhängiger Radikale:

- (1) NADPH-Oxidase



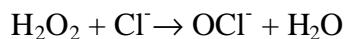
- (2) Superoxiddismutase



oder

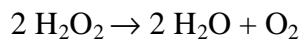
- (3)  $\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

- (4) Myeloperoxidase

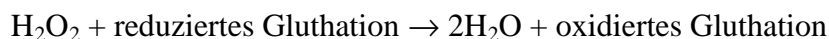


### Enzymreaktionen zum Abbau von $\text{H}_2\text{O}_2$ :

- (5) Katalase



- (6) Gluthationperoxidase



### Natürliche Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenzmessung ist geeignet, kleinste Sauerstoffradikalabgaben im Medium quantitativ und dynamisch zu messen. Die Geschichte der Chemilumineszenz lässt sich bis ins Altertum zurückverfolgen. Schon vor 3500 Jahren ist die Sonderform, die Biolumineszenz, beschrieben worden. Die erste rein anorganische Chemilumineszenzreaktion beobachtete H.

Brand 1669, als er Harn eindampfte und anschließend der trockenen Destillation unterwarf, wobei er den „Phosphorus mirabilis“ erhielt (*Albrecht, S. 1990*). Monozyten/Makrophagen bilden auf einen standardisierten Reiz (z.B. Zymosan) verschiedene chemische Reaktionsprodukte, die teilweise energetisch instabil sind (Sauerstoffradikale). Der Übergang von instabilen chemischen Zuständen in stabile führt zu einer Energiefreisetzung, die teilweise für das menschliche Auge als Lichtquanten sichtbar sind – diesen Vorgang nennt man Chemilumineszenz. Einige Substanzen, wie z.B. Lucigenin (bis-N-Methylacridiniumnitrat) können diese natürliche Chemilumineszenz um den Faktor  $10^2$ - $10^3$  verstärken. Lucigenin verstärkt insbesondere die Lichtemission von Superoxidradikalen, gebildet durch die NADPH-Oxidase. In der Vergangenheit sind verschiedene Analysesysteme (z.B. LUMIstar<sup>®</sup>) zur Messung der entstehenden Lichtquanten entwickelt worden. Mit diesen Apparaturen ist es möglich, die entstehenden Lichtquanten als Ausdruck der Reaktion von Monozyten auf Zymosan bei der Sauerstoffradikalbildung qualitativ und quantitativ als Reaktionskinetik zu erfassen. Es ist möglich, über die gesamte Beobachtungszeit die Menge und die Dynamik der Sauerstoffradikalbildung nach Zymosanaufnahme zu verfolgen. Ein Vergleich von Monozyten/ Makrophagen mit und ohne Nitroaromateneinfluss ist so möglich.

## **Zielsetzung**

In der hier vorgestellten Arbeit wird der direkte Einfluss von Trinitrotoluol (TNT) und seinen Metaboliten, also Substanzen, die man auf vielen ehemaligen Sprengstoffproduktionsstätten findet, auf das menschliche Immunsystem untersucht. Im großen Unterschied zu bisher gezeigten Arbeiten ist hier erstmals eine *in vitro* Untersuchung an menschlichen Zellen des Immunsystems gezeigt. Das Immunsystem ist ein wesentliches System zur Erhaltung der Integrität des Organismus. Im normalen Zustand werden fremde Organismen sicher erkannt und auf vielfältige Weise beseitigt. Ein nicht zu unterschätzender Abschnitt der Immunabwehr ist die unspezifische Reaktion von Monozyten, Makrophagen und anderen Zellen und freigesetzten Substanzen. Bei einer üblichen Infektion dauert es einige Tage, bis die spezifische Immunantwort die Erreger im günstigen Fall restlos beseitigt und dann eine dauerhafte starke Abwehrlage geschaffen hat. Bis dahin muß der Erreger von unspezifischen Zellen erkannt und an der Vermehrung gehindert werden. Typisch ist die Phagozytose der Erreger, die Prozessierung der Antigene und anschließende Präsentation für das spezifische Immunsystem, insbesondere den T- und B-Zellen. Fällt dieser entscheidene Schritt aus, kann es möglicherweise gar nicht oder nur zu sehr schwachen Immunantworten kommen und der Organismus schweren Schaden nehmen.

Aus diesem Grund soll für TNT als erstes die letal-toxische Grenze für Monozyten erarbeitet werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Frage, ob TNT eventuell von den Zellen des Immunsystems in andere Metabolite umgewandelt werden kann. Das ist aus rein funktioneller, aber auch toxikologischer Sicht interessant, da Reaktionsprodukte toxischer als die ursprünglich eingesetzten Substanzen sein können. Neben der Phagozytose ist bei Monozyten/Makrophagen die Abgabe von Sauerstoffradikalen sehr typisch. Sauerstoffradikale haben die Möglichkeit, sehr leicht mit Molekülen Reaktionen einzugehen und sie bis zur Funktionslosigkeit zu verändern. Im letzten Abschnitt möchte ich nun die Erfahrungen aus den ersten beiden Fragestellungen aufgreifen und einen funktionellen Toxizitätstest vorstellen, der erstmals primäre humane immunologische Zellen als Zielzellen zur Grundlage hat. Der Test ist so aufgebaut, dass man bei standardisierten Bedingungen die individuelle Beeinflussung der Monozyten durch Fremdstoffe auf einen physiologischen Reiz bei verschiedenen Substanzen

durchführen kann, eine Vergleichbarkeit mit anderen Spendern besteht und ggf. zur Ermittlung von Normalwerten geeignet ist.

## Material und Methoden

### Zellen

#### Primäre Zellen

Die Präparation und Isolation humaner Monozyten erfolgte aus dem *buffy Coat* gesunder Blutspender, der freundlicherweise von Prof. Dr. V. Kretschmer, Zentrum für Transfusionsmedizin der Universitätsblutbank Marburg, zur Verfügung gestellt wurde.

#### Zelllinie

Die humane monozytäre Suspensionszelllinie Mono Mac 6 (MM6) wurde 1985 aus dem Blut eines männlichen Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert. Mono Mac 6 exprimieren phänotypische und funktionelle Merkmale reifer Monozyten (Ziegler-Heitbrock, H. W. et al. 1988). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock, Institut für Immunologie, Universität München, zur Verfügung gestellt. Für die Kultivierung der Mono Mac 6 Zellen wurden ausschließlich 24-Loch-Platten der Firma Costar (Bodenheim, Nummer 163160) verwendet. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich durch Resuspendieren geerntet und anschließend bei 4 °C, 400·g für 7 Minuten zentrifugiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in frischem Medium auf  $1 \times 10^7$  Zellen / 50 ml eingestellt und in 2ml Portionen ausplattiert. Als Standardkulturmedium diente RPMI 1640 (500 ml, Seromed Biochrom KG Berlin) mit folgenden Zusätzen:

- Penicillin/Streptomycin der Firma Seromed Biochrom KG Berlin, A2213, **10 ml** mit 10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin.
- L-Glutamin 200 mM der Firma GIBCO BRL/LifeTechnologies, 25030-024, **5 ml**.
- Non-essential Amino-acids (100fach) der Firma Seromed Biochrom KG Berlin, K0293, **5 ml**.
- OPI-supplement Sigma, SIGMA, O-5003, **5 ml**; (enthält: Oxalsäure, Sodium-Pyruvat und Insulin).
- Fötale Kälberserum (30 Minuten inaktiviert bei 56 °C), Seromed Biochrom KG Berlin, **10-20 %**

## **Standardbedingungen im Umgang mit Zellkulturen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (*LaminarAir*, HLB 2448, *Heraeus*, *Osterode*) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank (*Cytoperm*, *Heraeus*, *Osterode*) als offenes System bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und kultiviert. Zentrifugationen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Tischzentrifuge (*Hettich-Rotanta*, *Hettich*, *Tuttlingen*) durchgeführt. Alle in der Zellkultur verwendeten Substanzen wurden auf eine Endotoxinkontamination mit dem Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test s.u. überprüft.

## **Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test**

Der Limulus-Amöbocyten-Lysat (LAL)-Test (*Bio-Whittaker*, *Walkersville MD, USA*) wird eingesetzt, um eventuelle Endotoxinverunreinigung in Zellkulturmedien und Zusätzen aufzuzeigen. Alle eingesetzten Medien, Seren und Reagenzien wurden auf Endotoxinfreiheit überprüft. Die Messwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenze, so dass eine unspezifische Stimulation der Zellen mit Endotoxin ausgeschlossen werden konnte.

## **Zellzahlbestimmung**

Alle Zellzahlbestimmungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellen wurden mit Türkisblau (*Merck*, *Darmstadt*) gefärbt. Zur Ermittlung des Mittelwerts wurden jeweils vier Eckquadrate ausgezählt. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl} \cdot \text{Eckquadratzahl} / \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

## **Überprüfen der Zellvitalität**

### **Mikroskopie**

Die Zellen wurden regelmäßig mikroskopiert und auf Veränderungen geachtet, die die äußere Form, aber auch die Verteilung der Zellen in der Kulturschale betrafen. Runde und gleichmäßig verteilte Monozyten sprachen für einen ruhenden, nicht stimulierten Zustand der Zellen (*Ziegler-Heitbrock, H. W. et al 1988*)



## Trypanblau-Färbetest

Der Trypanblau-Färbetest ist ein weit verbreiteter Färbetest, der eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen erlaubt. In toten Zellen reichert sich der Farbstoff an (tiefe Blaufärbung), vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff aktiv aus dem Zytoplasma zu entfernen und bleiben ungefärbt.

Die Vitalität der Monozyten wurde überprüft, indem 50 µl der Zellsuspension 1:2 mit 0,25 %-iger Trypanblau (Serva, Heidelberg) verdünnte. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurden die toten (tiefblauen) und lebenden (ungefärbten) Monozyten gezählt.

## Bestimmung der Stoffwechselaktivität

### MTT-Test

Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen von mitochondrialen Dehydrogenasen am Tetrazolring enzymatisch gespalten und in das wasserunlösliche dunkelblaue Formazan überführt. Die optische Dichte (OD) des blauen Formazan ist direkt proportional zur Anzahl der Zellen und deren Stoffwechselaktivität (*Mosmann, T. 1983*). Zu 100 µl Zellsuspension wurden in einer 96-Lochplatte (*Greiner*) 10 µl MTT-Lösung (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) mit einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS<sup>def</sup> gegeben und für drei Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Zur Lyse der Zellen und zum Lösen des Formazan-Farbstoffs wurden 100 µl 20 %-iges SDS-DMF (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml 50 %-igem N,N-Dimethylformamid, *Serva, Heidelberg + Merck, Darmstadt*) hinzupipettiert. Nach weiteren 12 Stunden Inkubation bei 37 °C folgte die Messung der Absorption im Mikrotiterplatten-Photometer (*MR 7000, Dynatech, Denkendorf*) bei 570 nm gegen 670 nm als Referenzwellenlänge.

### EZ4U-Test

Zellen mit intakten Ribosomen sind in der Lage, ein Chromophor wie beispielsweise Tetrazoliumsalz in Formazanderivate umzuwandeln. Dieses Prinzip ist auch Grundlage des MTT-Tests. Der Unterschied gegenüber dem MTT-Test ist bei dem nichtradioaktiven Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest EZ4U (*Biomedica GmbH, BI-5000*), dass die Zellen nicht lysiert werden müssen, man die Zellen nach der Messung als Kultur weiterführen kann und der EZ4U-Test sich auch sehr gut für Suspensionskulturen eignet (*Biomedica GmbH, 1994*). In

einer Platte mit 96 Vertiefungen (*Greiner*) wurden zu 100 µl Zellsuspension 10 µl des strohgelben und auf 37 °C erwärmten EZ4U-Substrats gegeben. Der Ansatz wurde bei Kulturbedingungen über drei Stunden inkubiert und anschließend die Absorption im Mikrotiterplatten-Photometer (*MR 7000, Dynatech, Denkendorf*) bei 450 nm gegen 620 nm Referenzwellenlänge gemessen. Das EZ4U-Substrat wurde jeweils frisch nach Anleitung der Produktinformation angesetzt.

### ***Metabolisierung von TNT durch Monozyten***

Es konnte gezeigt werden, dass Pilze und Bakterien im Boden und Wasser in der Lage sind, Xenobiotika wie TNT zu metabolisieren (*Walker, J. E. und Kaplan, D. L., 1992, Bruns-Nagel, D. et al. 1996, Breitung, J. et al. 1995*). Nach Inkorporation konnte beim Menschen die Bildung von 4-Amino-2,6-dinitrotoluol und 2-Amino-4,6-dinitrotoluol als Metabolite von TNT beobachtet werden. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über den Urin (*Henschler 1988, Layton et al. 1987*). Eine Untersuchung an menschlichen Monozyten ist bisher nicht bekannt. In PBS<sup>def</sup> gelöstes TNT (*Fluka*) wurde in Endkonzentrationen von 0,1 µg/ml bis 10,0 µg/ml zu  $0,5 \times 10^6$  Mono Mac 6 in einem Milliliter Kulturmedium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 12 h, 24 h, 48 h und 72 h bei Standardkulturbedingungen in einer 24 Loch Platte (*Nunclon*), wurden 500 µl zellfreier Überstand abgenommen und sofort bei –20 °C und Dunkelheit bis zur Analyse aufbewahrt. Die qualitative und quantitative Analyse erfolgte mit einer HPLC-UV der Umwelthygiene Marburg durch Dr. D. Bruns-Nagel. Als Kontrolle wurden parallel Kulturmedium ohne Zellen, ohne TNT und Kulturmedium ohne Zellen mit TNT stetig mitgeführt. Alle HPLC Messungen wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt.

### ***Isolierung und Anreicherung primärer humaner Monozyten***

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von primären humanen Monozyten wurden frische *buffy coats* aus dem Blut gesunder Blutspender der Abteilung für Transfusionsmedizin im Klinikum der Philipps-Universität Marburg verwendet. *Buffy coats* entstehen bei der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten. Sie enthalten neben PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) auch Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Die Gewinnung der PBMC-Fraktion erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode, die die PBMC-Fraktion von den restlichen Blutzellen abtrennt (*Boyum, A. 1968*). Zur PBMC-Fraktion gehö-

ren neben Monozyten auch B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Die Isolierung der Monozyten aus der PBMC Fraktion erfolgte mit Hilfe der Elutriation.

### **Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation**

In sterile 50 ml Cellstar PP-Röhrchen (*Greiner, Nürtingen*) wurden 12 ml Ficoll (Dichte: 1,077 g/ml, *Biochrom, Berlin*) vorgelegt und vorsichtig mit *buffy coat-Blut* überschichtet, ohne die beiden Phasen zu vermischen (Endvolumen: 50 ml). Der Ansatz wurde mit 400 g bei Raumtemperatur für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die Erythrozyten und Granulozyten finden sich als Sediment am Boden, darüber eine klare Ficollphase, darüber eine Interphase mit PBMCs und als oberste Schicht Serum mit Thrombozyten. Die Serumfraktion wurde verworfen. Die PBMCs wurden in ein neues 50 ml Cellstar PP-Röhrchen überführt und in 4 °C kaltem PBS<sup>def</sup> resuspendiert und zweimal bei 4 °C mit 350 g 7 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen wurden die PMBCs in 40 ml RPMI<sup>supp</sup> aufgenommen und im direkten Anschluss durch Elutriation die Monozytenfraktion isoliert.

### **Elutriation**

Bei der Elutriation handelt es sich um einen Zentrifugationsvorgang mit einem gleichzeitig entgegengesetzten kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom. Die Zentrifugalkräfte der Rotation führen zu einer Sedimentation der Zellen, der Flüssigkeitsstrom wirkt als Zentripetalkraft in entgegengesetzter Richtung. Jede Zelle ordnet sich in der Separationskammer in einer Zone an, in der auf die Zelle ein Gleichgewicht der Kräfte herrscht. Die Zellen trennen sich nach Dichte und Größe auf und werden durch die spezielle Konstruktion der Separationskammer in einem Fließgeschwindigkeitsgradienten gehalten. Durch Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder Verringerung der Rotordrehzahl können relativ homogene Zellfraktionen gewonnen werden (*Grabske, R.J. 1978, Figdor, C. G. et al. 1983*).

Der mathematische Zusammenhang zwischen der Flüssigkeitsrate (Zentripetalkraft) und der Rotordrehzahl (Zentrifugalkraft) auf die Zellgröße lässt sich folgendermaßen ausdrücken (*Beckmann, Instruction Manual*):

$$F = X \cdot D^2 \cdot (\text{RPM} \cdot 10^{-3})^2$$

F	=	Flüssigkeitsrate in ml/min
X	=	Kammerfaktor: <i>hier</i> <b>0,0511</b>
D	=	Zelldurchmesser in mm
RPM	=	Rotationsumdrehungen pro min

Bei einer konstanten Drehzahl lässt sich über die Veränderung der Flussrate die Art (Größe/Dichte) der ausgespülten Zellenfraktion steuern. Für die Elutriation wurde das JE-6B-System mit dazugehörigem Rotor und Separationskammer (4,2 ml) verwendet (*Beckmann, Palo Alto*). Die Elutriation erfolgte bei konstanter Rotordrehzahl von 3000 Umdrehungen pro Minute. Das 4 °C kalte Elutriationsmedium bestehend aus PBS<sup>def</sup> 0,1 % BSA und 0,01 % EDTA. Die Fließgeschwindigkeit wurde schrittweise entsprechend der Eichkurve für die Pumpleistung erhöht, und pro Elutriationsvorgang etwa  $3\text{-}5 \times 10^8$  PBMCs eingesetzt. Die PBMC-Fraktion in 40 ml RPMI<sup>supp</sup> wurde bei 7 ml/min Pumpleistung in die Separationskammer aufgenommen. Nachdem alle Zellen aufgenommen waren, wurde die Pumpleistung auf 15ml/min erhöht. Verbliebene Erythrozyten und Thrombozyten wurden so entfernt. Ein schrittweises Erhöhen der Flussrate auf 28,5 ml/min führte zur Entfernung von Lymphozyten und NK-Zellen. Bei 36 ml/min wurden die Monozyten vollständig separiert und in 100 ml Elutriationsmedium aufgenommen. Die Monozytenzellfraktion wurde bei 350 g für 10 Minuten und 4 °C gewaschen, das Sediment vorsichtig resuspendiert und in 10 ml RPMI<sup>supp</sup> aufgenommen. Die Zellzahl der Suspension wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf  $6,25 \times 10^6$  /ml in RPMI<sup>supp</sup> mit 2 % humanem AB-Serum eingestellt.

## **Reinheit der durch Elutriation gewonnenen Monozyten**

Der Reinheitsgrad der präparierten Monozyten wurde mit Hilfe einer histologischen Färbung bestimmt. Die Färbung wurde unter Verwendung eines kommerziellen Testsystems (*Diff-Quick, Baxter Diagnostics, Schweiz*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung ergab einen Monozytenanteil von über 90 %. Die durch Dr. A. Kaufmann (Institut für Immunologie, der Philipps-Universität Marburg) parallel durchgeführte Alpha-Naphtylacetat-Esterase-Färbung ergab eine Monozytenreinheit von 97 % und die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit monozytenspezifischen Antikörpern eine Reinheit von mehr als 92 % (*Kaufmann, A. 1998*).

## **Eingesetzte Nitroaromate**

Es wurden Trinitrotoluol und einige exemplarische Metabolite eingesetzt. Alle Substanzen können auf ehemaligen Rüstungsstandorten gefunden werden. (*Haas & Preuss, 1987*)

Trinitrotoluol	TNT
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	4-ADNT
2-Amino-4,6-Dinitrotoluol	2-ADNT
2,4-Diamino-6-Nitrotoluol	2,4-DNT
4-Acetylamino-2,6-Dinitrotoluol	4-Acetyl-2,6-DNT
2-Acetylamino-4,6-Dinitrotoluol	2-Acetyl-4,6-DNT

Alle Nitroaromate wurden als Reinstoffe (*Fluka Chemie*) in kristalliner Form in PBS<sup>def</sup> gelöst und anschließend steriltfiltriert (*Millipor*, 0,2 µm). Die Stammlösungen wurde bei 4 °C und Dunkelheit aufbewahrt.

## **Stimulation mit Zymosan**

Zymosan ist ein Bestandteil der Zellmembran von dem weit verbreiteten Pilz *Candida albicans* und führt bei Monozyten/ Makrophagen nach Phagozytose zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen als Ausdruck einer Stimulation (*Lilius, E. M. und Wari, M. 1984*). Fünf Spatelspitzen Zymosan der Firma *Serva* wurden in 20ml sterilem PBS<sup>def</sup> gelöst und im Ultraschallbad fünf Minuten bei Stufe 9 (höchste Stufe) suspendiert. Das Gemisch wurde 30 Minuten gekocht und anschließend bei 3000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellmasse in 10 ml sterilem PBS<sup>def</sup> resuspendiert und auf eine Partikelzahl von

$3 \times 10^8$  Partikel/ml eingestellt. 0,6 ml-Portionen wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum Versuchseinsatz eingefroren. Unmittelbar vor dem Einsatz von Zymosan wurde die auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmte Suspension einige Minuten bei maximaler Stufe im Ultraschallbad beschallt, um eine gleichmäßige Partikelverteilung zu gewährleisten.

### ***Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)***

Die Messungen erfolgten freundlicherweise durch Dr. Dirk Bruns-Nagel, Umwelthygiene der Philipps-Universität Marburg. Die HPLC-Anlage der Firma Gyntek (München) bestand aus folgenden Komponenten:

- DEGASYS DG-2410 Degaser
- M480 Pumpe
- Gina 50 Autosampler
- 340 S Dioden Array Detektor
- Säulenofen mit  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Säule: Nucleosil 120-3 C18 (3 mm x 25 cm, CS-Chromatographie Service, Langerwehe)
- Vorsäule: Nucleosil 120-5 C18
- Auswertungssoftware: Gynksoft 5.32

In der HPLC wurden ausschließlich zellfreie Zellkulturüberstände quantitativ und qualitativ untersucht. Im Wellenbereich von 200 – 400 nm wurden UV-Spektren aufgenommen. Die Detektion erfolgte bei 230nm. Die Peakzuordnung wurde über die Retentionszeit und das UV-Spektrum durchgeführt. Es stand eine Spektrenbibliothek mit über 80 sprengstoffspezifischen Verbindungen zur Verfügung. Die Bibliothek wurde freundlicherweise von Dr. K. Steinbach (FB Chemie der Philipps-Universität Marburg) bereitgestellt.

### ***Chemilumineszenz***

Chemilumineszenz bezeichnet die Abgabe von Lichtquanten bei chemischen Reaktionen. Ein anderer Begriff ist chemisches Leuchten. Einige Reaktionen können so viele Lichtquanten pro Sekunde abgeben, dass das Licht für das menschliche Auge sichtbar wird. Die Chemilumi-

neszenzmessung (*LUMIstar*, *bmg*) ermöglicht die Quantifizierung abgegebener Lichtquanten pro Sekunde bei chemischen Reaktionen, beispielsweise in Zellkulturen. Die Aufzeichnung der Lichtquanten erfolgt im online-Verfahren über jeweils eine Sekunde. Die Messung wurde 30 mal im Abstand von 90 Sekunden wiederholt. Die Lichtquanten pro Sekunde wurden als Reaktionskinetik aufgezeichnet und das Integral als Summenwert der Einzelwerte abgeschätzt. Die Monozyten/Makrophagen wurden auf eine Zellzahl von  $6,25 \times 10^6$  ml in Standardkulturmedium eingestellt und je 100 µl dieser Zellsuspension pro Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert. Dazu kamen 100 µl der in PBS<sup>def</sup> gelösten Nitroaromaten mit Endkonzentrationen von 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml bis 50 µg/ml. Nach einer Inkubation der Monozyten unter Zellkulturbedingungen über 24 Stunden folgte die Chemilumineszenzmessung. Jeder Ansatz wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Kontrolle wurde bei jeder Messung eine Sechsfachbestimmung mit 100 µl PBS<sup>def</sup> ohne Nitroaromat mitgeführt. Nach 24 Stunden wurden 10 µl einer frisch angesetzten Lucigeninlösung ( $2,35 \times 10^{-3}$  M) hinzugegeben und weitere 15 Minuten bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Unmittelbar vor der Chemilumineszenzmessung wurden 10 µl Zymosanpartikel (50 Partikel:1 Zelle) zu den Zellen pipettiert. Die Messung startete im *LUMIstar professional* der Firma *bmg* mit der Zymosanzugabe. Alle 90 Sekunden wurde für eine Sekunde über dem selben Napf die Lichtquantenmenge gemessen. Dieser Zyklus wurde für alle 54 Felder (siehe Belegungsschema) 30 mal wiederholt. Die Summe der Einzelwerte entspricht der Lichtquantenmenge über 45 Minuten. Der Mittelwert der PBS<sup>def</sup> - Kontrolle (ohne Nitroaromatenzusatz) wird als 100 % mögliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildung auf Zymosan mit entsprechender Lichtemission festgelegt. Der relative Bezug der Messwerte innerhalb einer Platte ermöglicht die Vergleichbarkeit der Messwerte zwischen verschiedenen Blutspendern.

#### Tabellarisch Versuchsablauf:

100 µl/Loch mit  $6,25 \times 10^5$  Monozyten in 96er Lochplatte  
 + 100 µl/Loch Testsubstanz, gelöst in PBS<sup>def</sup>  
 24 Stunden Inkubation bei Standardkulturbedingungen  
 + 10 µl/Loch Lucigenin  
 15 Minuten Inkubation bei Standardkulturbedingungen  
 + 10 µl/Loch Zymosan  
 START der Lichtquantenmessung





## Experimente und Ergebnisse

Im ersten Abschnitt wird der Einfluss von Trinitrotoluol auf die Vitalität menschlicher Monozyten am Beispiel der Tumorzelllinie Mono Mac 6 mit verschiedenen Testsystemen untersucht. Zwei häufig verwendete Vitalitätstestprinzipien sollen hier angewendet werden, ein einfacher, schnell und überall durchführbarer Test mit Trypan-blau und ein weniger Untersucher abhängiger, aber aufwendiger Vitalitätstest mit Formarzankristallen, der EZ4U-Test. Als zu testende Zellen wählten wir die Monozytenzelllinie Mono Mac 6 aus, um möglichst identische Versuchsbedingungen beibehalten zu können.

### ***Bestimmung der Vitalität mit der Trypanblau Färbung***

Das zu untersuchende Dosisintervall sollte realistisch beim Menschen zu erreichen sein und neben akut toxischen Dosen eine Aussage über die zeitliche Entwicklung auf die Zellen zulassen. Nach Vorexperimenten entschieden wir uns für ein Dosispektrum von 0,1 µg/ml bis 10,0 µg/ml. Die Tumorzelllinie Mono Mac 6, wurde in RPMI<sup>supp</sup> Medium mit 10% FCS in 24 Loch-Platten (*Costar*) kultiviert. Die Zellzahl in einem Napf betrug  $0,5 \times 10^6$  /ml. Die Verdopplungszeit der Zellen lag unter Kulturbedingungen bei etwa 2 Tagen. In PBS<sup>def</sup> gelöstes TNT wurde mit den Endkonzentrationen 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml und 10,0 µg/ml zu  $0,5 \times 10^6$  Mono Mac 6 pipettiert. Auf jeder Platte wurde eine Kontrolle mit gleichem Volumen Lösungspuffer ohne TNT und gleicher Zellzahl mitgeführt. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach 3, 12, 24 und 48 Stunden mit der Trypanblau-Färbemethode. Zu 200 µl Zellsuspension wurden 50 µl einer 0,25 % Trypanblau-Lösung (*Serva*, Heidelberg) geben. Nach zwei Minuten Inkubation konnten tiefblaue (tote) und leuchtende, nicht gefärbte (lebende) Zellen unter dem Lichtmikroskop differenziert und gezählt werden. Es wurden in einer Doppelbestimmung jeweils etwa 600 Zellen auf ihre Vitalität hin untersucht und gezählt.

#### *A: Einfluss der Einwirkzeit von TNT auf die Vitalität (Abb. 0-1)*

TNT war in den hier untersuchten Dosisbereichen nicht akut toxisch für die Monozyten. Nach einer kurzen Inkubation von drei Stunden ließen sich keine dosisabhängigen Einschränkungen der Vitalität bei den Monozyten feststellen. Nach 12 Stunden Kultur zeigten die Monozyten bei 10 µg/ml TNT einen etwas verminderten Anteil an lebenden Zellen gegenüber der Kontrolle. Nach 24 Stunden in TNT angereichertem Medium stieg zwar bei allen Gruppen der

Anteil an lebenden Zellen an, bezogen auf die Kontrolle wiederholte sich die nach 12 Stunden gesehene Beobachtung des verminderten Anteils an lebenden Zellen bei 10 µg/ml TNT. Nach 48 Stunden war mit steigender TNT-Dosis ein zunehmender Verlust an lebenden Monozyten zu beobachten. Der Anteil der lebenden Zellen zum Zeitpunkt nach 24 Stunden war in Bezug auf die Kontrolle vergleichbar mit dem Zeitpunkt 12 Stunden. Auffällig war, dass bei allen, auch bei TNT-Dosierungen von 5 µg/ml und mehr, der Anteil der lebenden Monozyten stieg. Zwei Erklärungen sind möglich: 1. Die Zellen teilen sich und der Anteil lebender Zellen steigt vorübergehend an, oder 2. die toten Zellen zerfallen in nicht als Zellen anzusprechende Partikel und entziehen sich so der Bewertung.

*B: Einfluss der TNT-Konzentration auf die Vitalität von Monozyten (Abb. 0-2)*

Die TNT-Konzentration hatte einen Einfluss auf die Vitalität von Mono Mac 6. Mit zunehmender Konzentration an TNT sank der Anteil überlebender Monozyten. Bei einer Konzentration von mehr als 1,0 µg/ml TNT kam es nach einer Inkubation von 48 Stunden zu einer deutlichen Verminderung lebender Monozyten.

**A: Einfluß der Inkubationsdauer**

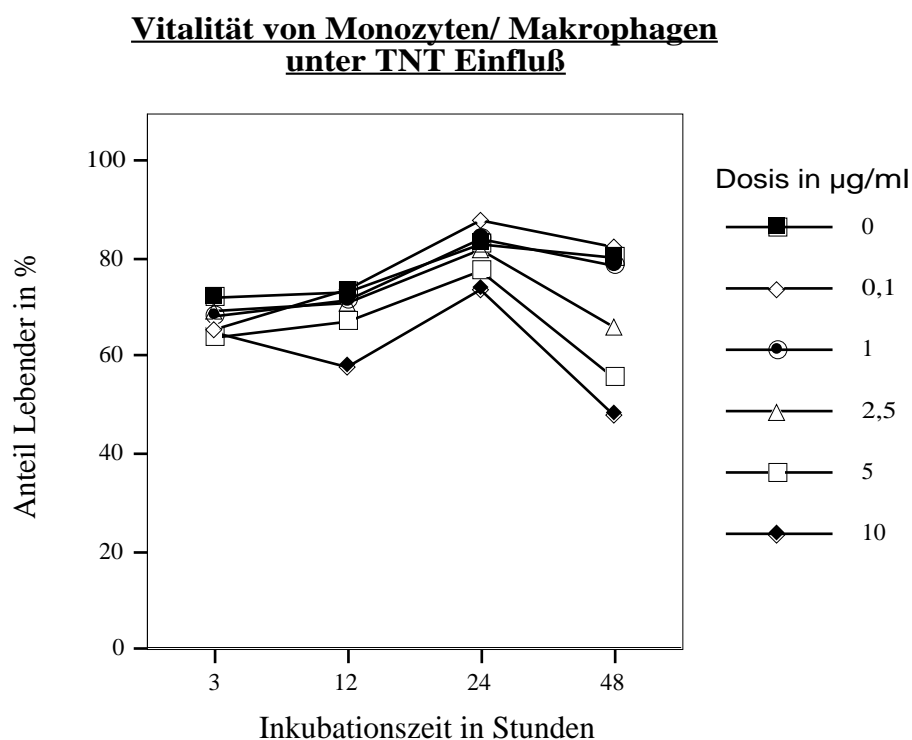


Abbildung 0-1

## B: Einfluß der TNT-Konzentration

**Vitalität von Monozyten/ Makrophagen**  
**unter TNT Einfluß**

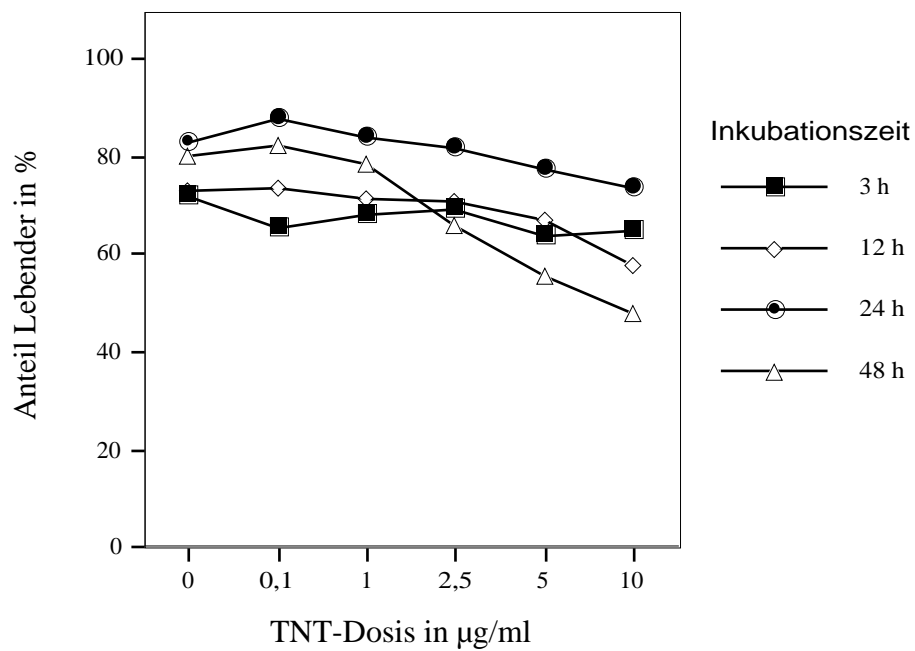


Abbildung 0-2

Tabellarische Zusammenfassung

**TNT-Konzentrationen gegen Inkubationszeiten**

*Anteil der lebenden Mono Mac 6 [in %] unter TNT Einfluss*

	3 h	12 h	24 h	48 h
Kontrolle	72,33	73,40	83,33	80,61
0,1µg/ml	65,84	73,96	87,89	82,74
1,0µg/ml	68,60	71,57	83,94	78,82
2,5µg/ml	69,43	71,35	82,14	66,24
5,0µg/ml	63,91	67,03	77,69	55,90
10,0µg/ml	64,85	58,05	74,04	48,25

### ***Vitalitätsbestimmung mit dem nichtradioaktiven EZ4U-Test***

Mit dem experimentell aufwendigeren, aber anwenderunabhängigeren Vitalitätstest EZ4U sollte der Test mit Mono Mac 6 und TNT wiederholt werden, um beide Testsysteme zu vergleichen. Die Monozytenstammzelllinie Mono Mac 6 wurde in RPMI<sup>supp</sup> Medium mit 10 % FCS kultiviert und auf  $0,5 \times 10^6$  /ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden pro Napf einer 96 Loch-Platte (*Costar*) 100 µl gegeben. In PBS<sup>def</sup> gelöstes TNT wurde mit den Endkonzentrationen 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml und 10,0 µg/ml zu  $0,5 \times 10^5$  Mono Mac 6 pipettiert. Auf jeder Platte wird eine Kontrolle mit gleichem Volumen Lösungspuffer ohne TNT und gleicher Zellzahl mitgeführt.

#### **Stoffwechselleistung von Mono Mac 6 unter TNT Einfluß**

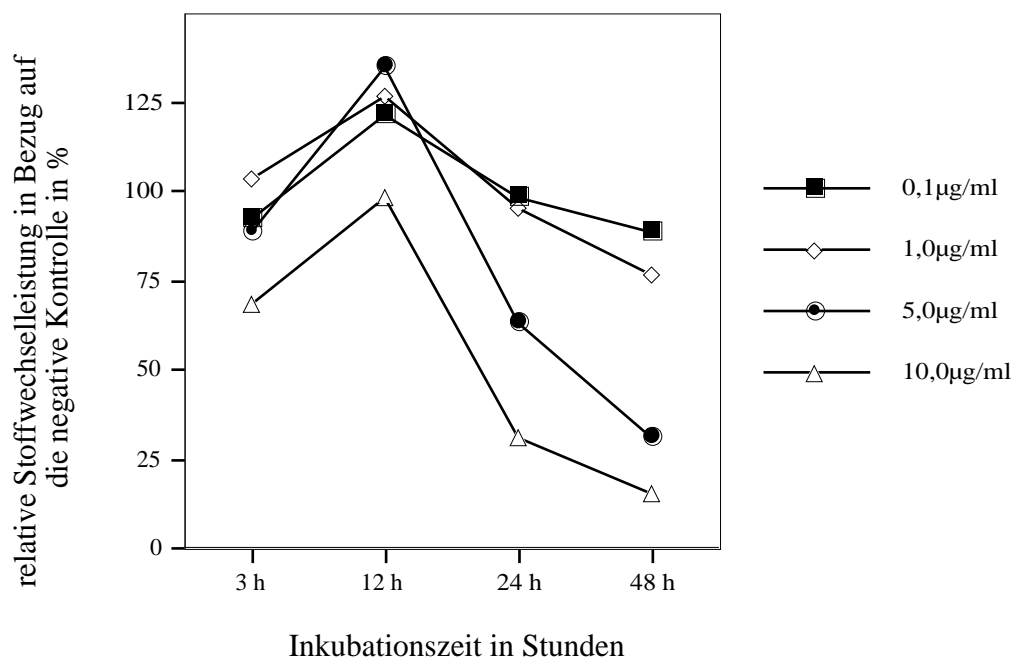


Abbildung 0-3

Alle Messwerte stellen parallel durchgeführte 4-fach Bestimmungen dar. Zu jedem Napf wurden 20 µl des strohgelben auf 37 °C erwärmten Substrats (EZ4U-Kit) drei Stunden vor Ende der Kulturzeit unter TNT Einfluss gegeben. Die Inkubation wird unter Zellkulturbedingungen abgeschlossen. Die Absorption des gebildeten Farbstoffs Formazan wird im Plattenphotometer bei 450 nm gegen 630 nm gemessen. TNT verursachte im EZ4U-Test in Mono Mac 6

Zellen nach einer Gesamtinkubation von drei Stunden bei einer Dosis von 10,0 µg/ml eine deutlichen Vitalitätseinschränkung auf 69% (Abb.0-3). Nach 24 und mehr Stunden Inkubation unter mehr als 5 µg/ml TNT Einfluss sanken die Stoffwechselleistungen in Bezug auf eine unbelastete Vergleichsgruppe auf weniger als 1/3 der Ausgangsleistung. Bei geringen TNT Konzentrationen war die Vitalitätseinschränkung nur angedeutet (1 µg/ml nach 48 Stunden 77 %). Bei TNT Konzentrationen von 5 µg/ml und mehr war die Vitalitätseinschränkung bis auf 16 % (10,0 µg/ml nach 48 Stunden) der Kontrollgruppe sehr deutlich.

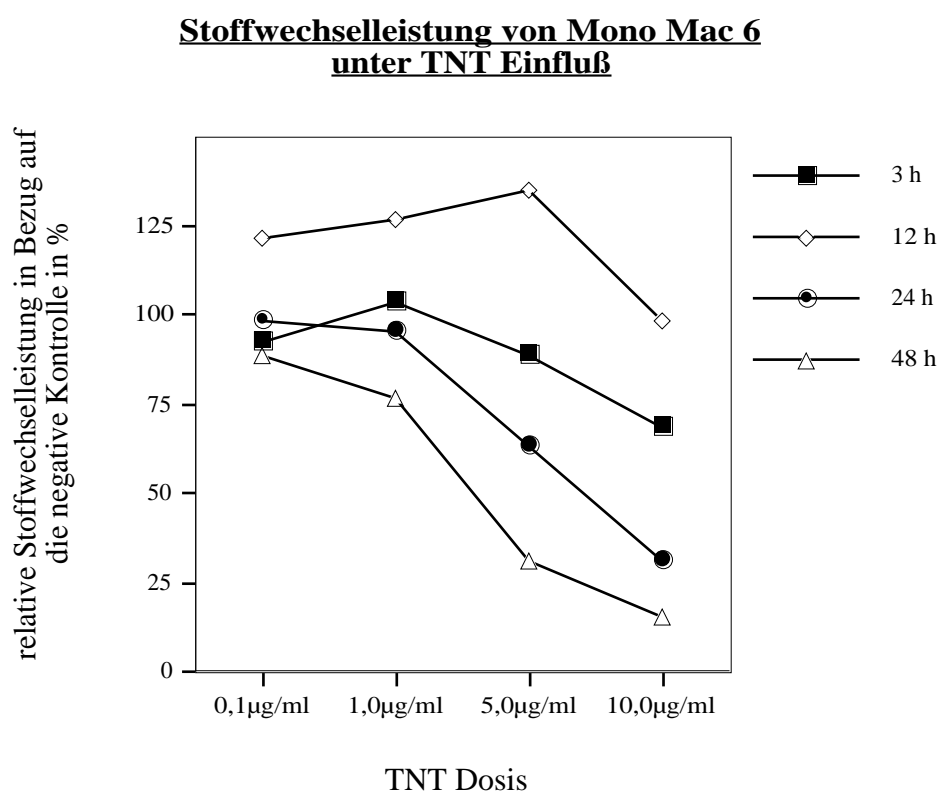


Abbildung 0-4

Sicher bemerkenswert war bei allen untersuchten TNT Konzentrationen die sehr hohe Stoffwechselleistung der Monozyten zum Messzeitpunkt 12 Stunden, die gleichzeitig auch die maximale Stoffwechselleistung bei allen untersuchten TNT-Konzentrationen darstellte. Ob eine kurzfristige Stoffwechselleistungssteigerung toxisch begründet ist, wurde hier nicht weiter untersucht. Eine ED<sub>50</sub> für TNT liegt zwischen 24 und 48 Stunden bei 5,0 µg/ml. Innerhalb

der ersten 24 Stunden liegt die  $ED_{50}$  bei 10  $\mu\text{g/ml}$  TNT. Für Werte von weniger als 5,0  $\mu\text{g/ml}$  lassen sich aus diesem Versuch keine  $ED_{50}$  ermitteln.

**Stoffwechselleistung [%] von Mono Mac 6  
im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne TNT**

	3 h	12 h	24 h	48 h
0,1 $\mu\text{g/ml}$	93	122	99	89
1,0 $\mu\text{g/ml}$	104	127	96	77
5,0 $\mu\text{g/ml}$	89	135	64	32
10,0 $\mu\text{g/ml}$	69	99	32	16

**Absorptionswerte für verschiedene TNT-Konzentrationen  
und Inkubationszeiten im EZ4U Test**

	3 Stunden		12 Stunden		24 Stunden		48 Stunden	
	Mittelw	Stabw.	Mittelw	Stabw.	Mittelw	Stabw.	Mittelw	Stabw.
Vergleichsgruppe	1,052	0,068	1,173	0,009	1,198	0,065	1,477	0,062
0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,976	0,056	1,436	0,027	1,19	0,045	1,308	0,027
1,0 $\mu\text{g/ml}$	1,096	0,038	1,489	0,081	1,152	0,044	1,133	0,058
5,0 $\mu\text{g/ml}$	0,935	0,027	1,586	0,041	0,77	0,014	0,468	0,006
10,0 $\mu\text{g/ml}$	0,73	0,068	1,158	0,045	0,389	0,003	0,235	0,023

***Gemeinsame Bewertung von Trypanblau-Färbung und EZ4U Test  
über die Toxizität von Trinitrotoluol (TNT) auf menschliche Mono-  
zyten/ Makrophagen***

In den beiden Vitalitätstesten, dem Trypanblau-Test und dem EZ4U-Test, konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, dass TNT toxisch auf menschliche Monozyten am Beispiel der Monozytenzelllinie Mono Mac 6 wirkte. Die toxische Dosis lag in beiden Untersuchungen bei mehr als 1,0  $\mu\text{g/ml}$  TNT und mehr als 24 Stunden Inkubation. Im Trypanblau-Test ist es möglich, lebende und tote Zellen zu differenzieren, Zwischenstufen entgehen der Bewertung.

Eine geeignete Ergänzung war die Bewertung der Stoffwechselleistung als Gesamtmaß für die Vitalität der untersuchten Zellpopulation. Kritisch ist der Einfluss der Zellteilung auf die Interpretation der Messergebnisse. Die Mono Mac 6 teilen sich alle 48 Stunden und lassen die Frage nach einer Zellteilungsstörung oder Absterben vorhandener Zellen offen. Beide Testsysteme konnten sicher die Toxizität von TNT auf Mono Mac 6 beschreiben, wobei auch die Schwächen durch die Zelllinie (sich teilende Zellen) deutlich wurde. Nach der toxikologischen Wirkung ist von ganz entscheidender Bedeutung, was mit Substanzen im Körper passieren kann. Viele Substanzen unterliegen im Körper Stoffwechselvorgängen. Im Urin von Munitionsarbeitern wurden nach Inkorporation neben TNT auch Metabolite von TNT festgestellt. Im nächsten Abschnitt soll untersucht werden, ob TNT durch Phagozyten metabolisiert werden kann.

### ***Untersuchung der Metabolisierung von Trinitrotoluol (TNT) durch die menschliche Monozytenzelllinie Mono Mac 6***

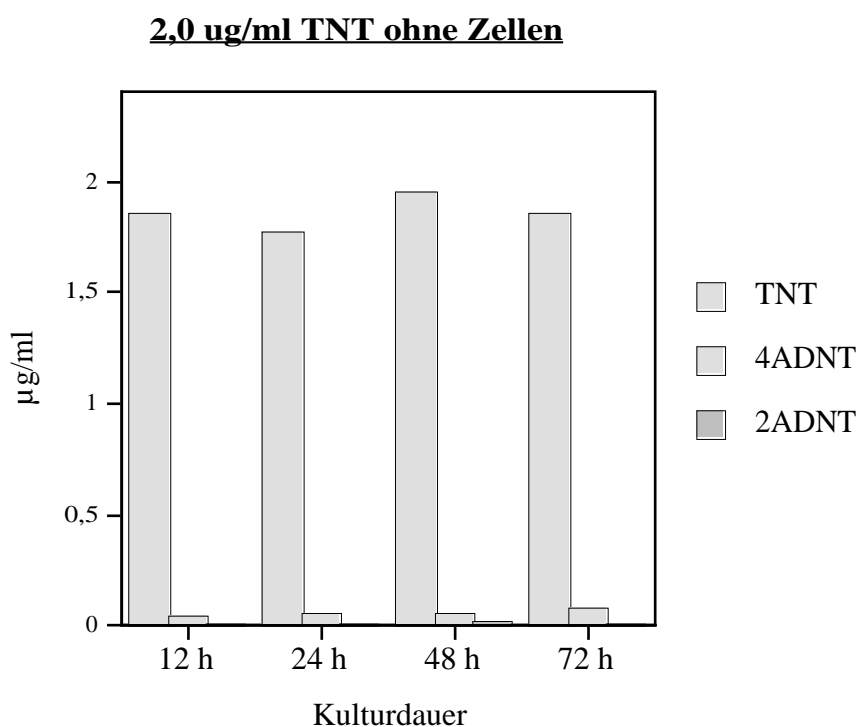


Abbildung 0-5

Die menschliche Monozytenzelllinie Mono Mac 6 wurde unter Standardbedingungen kultiviert, auf  $0,5 \times 10^6$  /ml Zellen eingestellt und je ein Milliliter der Zellsuspension pro Loch einer 24er Nunclon Platte pipettiert. Zu den Zellen wurde in PBS<sup>def</sup> gelöstes TNT mit den Endkonzentrationen 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml und 10,0 µg/ml hinzugegeben. Ein zellfreier Ansatz mit einer Konzentration von 2,0 µg/ml TNT wurde zeitgleich mitgeführt. Der zellfreie Ansatz diente zum Ausschluss unspezifischer chemischer Reaktionen durch das Kulturmedium oder die Kulturbedingungen gegenüber Trinitrotoluol. Nach 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden zellfreie Überstände vorsichtig abgenommen, zentrifugiert (10 min, 4 °C, 400 g) und bei –20 °C und Dunkelheit bis zur HPLC-Analyse aufbewahrt. Alle Ansätze wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Die qualitative und quantitative HPLC-Analyse wurde freundlicherweise von Dr. D. Bruns-Nagel in der Umwelthygiene der Philipps-Universität-Marburg durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer Bibliothek von bekannten Nitroaromaten verglichen.

*Analyse der Stabilität von TNT unter Kulturbedingungen ohne Zellzugabe (Abb. 0-5).*

Trinitrotoluol wurde weder durch das Zellkulturmedium, die Kulturbedingungen noch durch die Lagerung bei –20 °C verändert. Die eingesetzte TNT-Konzentration war auch nach 72 Stunden unter Zellkulturbedingungen vollständig und unverändert erhalten. Die Messwert-schwankungen überschritten nicht den bekannten Rahmen für Analysen im extrem niedrigen Konzentrationsbereich. Die sehr geringen Mengen an 4ADNT und 2ADNT lagen unterhalb der Aussagekraft der hier durchgeführten HPLC-Messung und waren daher nicht verwertbar.

*Stabilität von TNT in der Umgebung mit Monozyten unter Kulturbedingungen*

Bei einer sehr niedrigen, nicht toxischen TNT- Konzentration von nur 0,1 µg/ml kam es in einer Zellkultur mit Mono Mac 6 zu einer Metabolisierung von TNT zu 4ADNT und 2ADNT (Abb.0-6). Wegen der Nähe zum Grenzbereich der Messwertdifferenzierung (<0,05 µg/ml) der HPLC dürfen die genannten Werte für 0,1 µg/ml TNT nur als Tendenz aufgefasst werden. Die in der Abb.0-7 dargestellten Messwerte zeigen die Metabolisierung von 1,0 µg/ml TNT durch Mono Mac 6 zu 4ADNT und 2ADNT. Die Tendenz, die bei einer TNT-Konzentration von 0,1 µg/ml aufgezeigt wurde, wurde hier eindeutig unterstrichen. Es ist sehr schön zu sehen, wie TNT linear abnahm und zeitgleich die Anteile an 4-ADNT und 2-ADNT anstiegen.



Der Anteil an 4-ADNT lag über den gesamten Beobachtungszeitraum anteilig etwa drei- bis viermal über dem von 2-ADNT. Die bei 1,0 µg/ml TNT dargestellte Metabolisierung zu 4-ADNT und 2-ADNT wiederholte sich bei 2,0 µg/ml TNT. Vergleicht man den zellfreien Ansatz (2,0 µg/ml TNT, Abb.0-5) und den Ansatz mit Monozyten (2,0 µg/ml TNT, Abb.0-8), war der Unterschied an messbaren Metaboliten sehr deutlich. Der Anteil an 4-ADNT und 2-ADNT, der durch die Monozyten aus TNT gebildet wurde, überstieg die geringen Konzentrationen an Metaboliten im zellfreien Kulturansatz um ein Vielfaches. Die Menge an maximal metabolisiertem TNT lag nach 72 Stunden um 2 µg/ml TNT. Zusammenfassend kann man sagen, dass in 72 Stunden etwa 2,0 µg/ml TNT von  $0,5 \times 10^6$  Monozyten zu 4-ADNT und 2-ADNT metabolisiert werden können. Weitere bekannte Metabolite von TNT konnten im Zellkulturüberstand nicht festgestellt werden.

## TNT mit Mono Mac 6

■ TNT    ■ 4ADNT    ■ 2ADNT

Konzentration in ug/ml

**0,1 ug/ml**

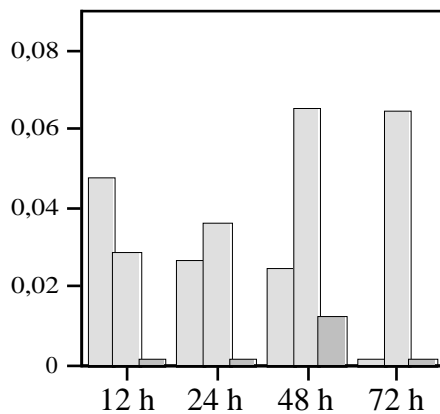


Abbildung 0-6

**1,0 ug/ml**

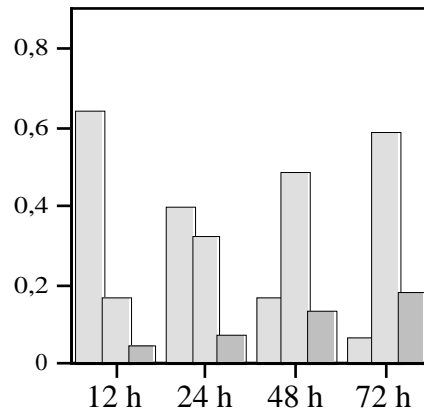


Abbildung 0-7

**2,0 ug/ml**

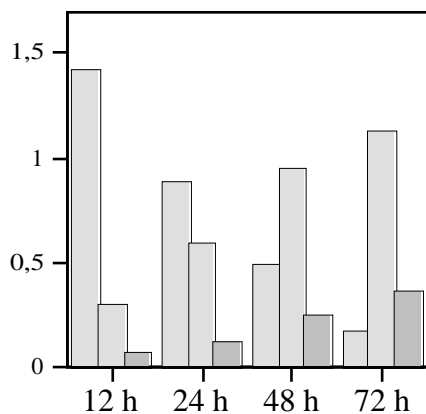


Abbildung 0-8

**10,0 ug/ml**

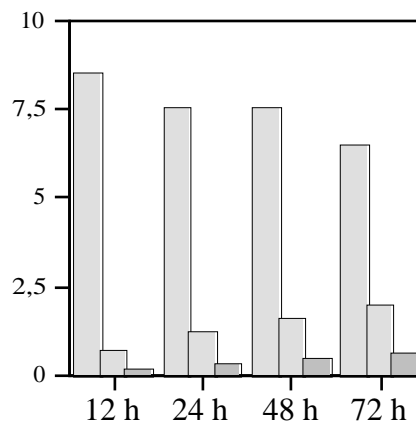


Abbildung 0-9

**Kulturdauer in Stunden**

Nachdem nun die Toxizität und die Metabolisierung von TNT mit Mono Mac 6 untersucht wurde, sollte nun die mögliche funktionelle Beeinflussung von Monozyten durch Nitroaromate untersucht werden. Wir wählten primäre humane Monozyten von gesunden Blutspendern aus, da sich die Mono Mac 6 wegen zu niedriger Sauerstoffradikalabgabe auf einen Standardreiz mit Zymosan nicht in unseren Testaufbau integrieren ließen. Der Nachteil ist der höhere experimentelle Aufwand und die Spenderdivergenz.

### ***Der Einfluss von Nitroaromaten auf die Reaktionsfähigkeit von primären menschlichen Monozyten gegen *Candida albicans*.***

Zymosan ist ein Membranbestandteil von *Candida albicans* und dient regelmäßig als Modell zur Phagozytose und unspezifischen Immunabwehr bei Makrophagen und Monozyten. Primäre menschliche Monozyten wurden aus *buffy coats* gesunder Blutspender mit der Hypaque-Dichte-Zentrifugation und anschließender Elutriation in einer Reinheit von >95 % gewonnen. Die gewonnenen Monozyten wurden auf  $6,25 \times 10^6$  Zellen/ml RPMI<sup>supp</sup> Medium (mit 2%-AB-Serum) eingestellt.

Belegungsschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		K	5	10	25	50	5	10	25	50		
C		K	5	Substanz A		50	5	Substanz B		50		
D		K	5	10	25	50	5	10	25	50		
E		K	5	10	25	50	5	10	25	50		
F		K	5	Substanz C		50	5	Substanz D		50		
G		K	5	10	25	50	5	10	25	50		
H												

Die Konzentrationen der Stammlösungen (in PBS<sup>def</sup> gelöste Nitroaromate) wurden mit der HPLC kontrolliert und steril bei Dunkelheit bis zum Versuchseinsatz aufbewahrt.

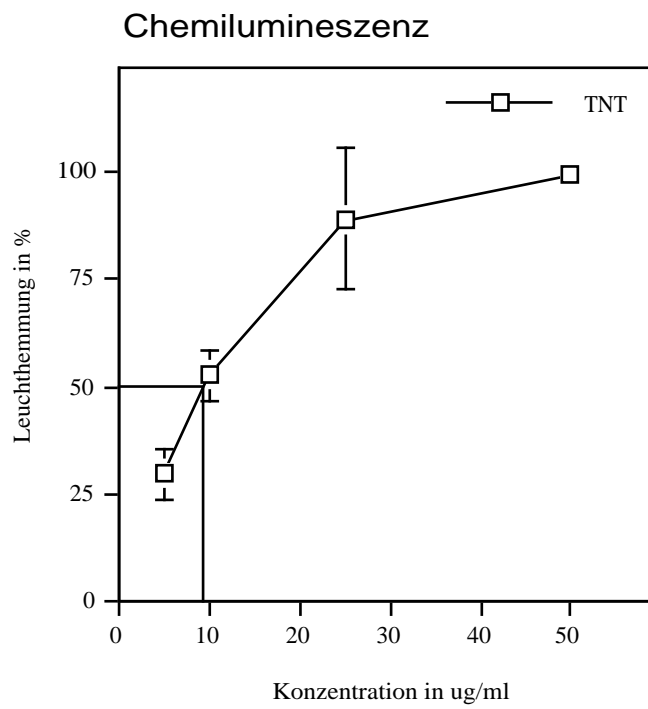


Abbildung 0-10

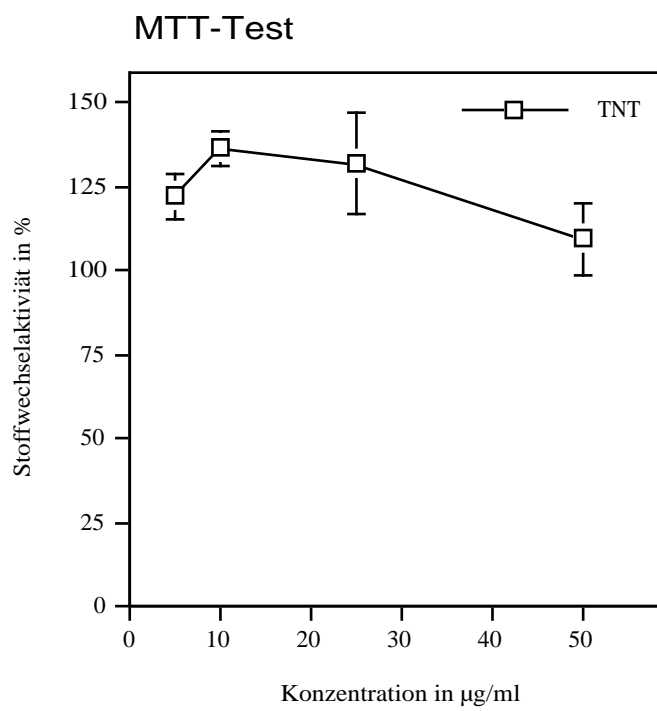


Abbildung 0-11

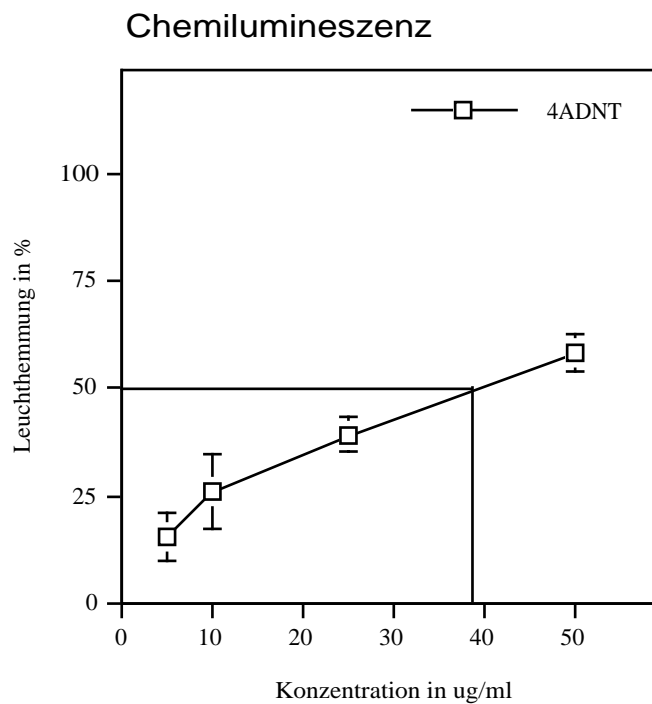


Abbildung 0-12

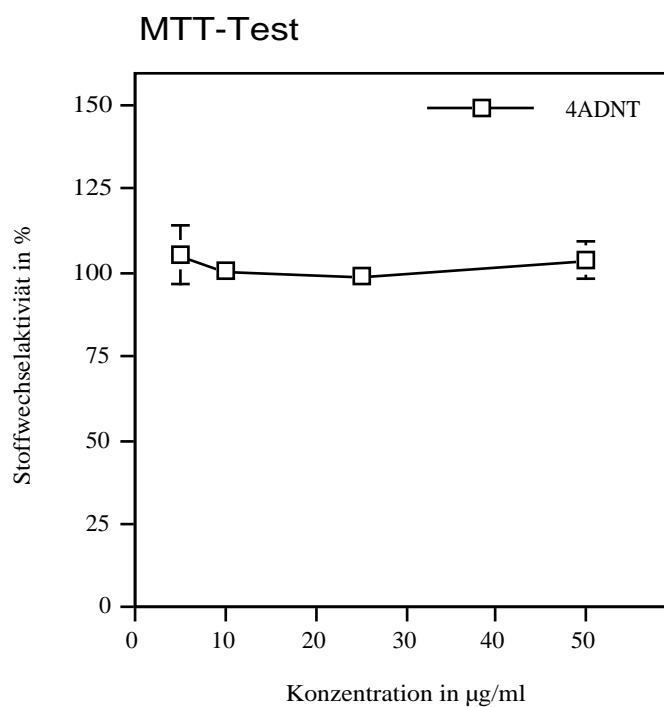


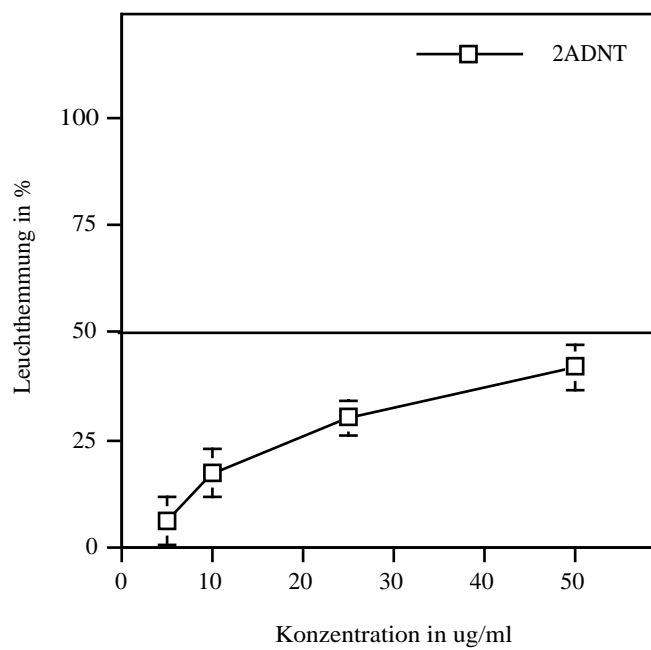
Abbildung 0-13

Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden 100 µl der Zellsuspension und 100 µl der gelösten Testsubstanz in den Endkonzentrationen 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml (Dreifachbestimmung) gegeben. Die verwendeten Nitroaromaten waren: TNT, 4-ADNT,

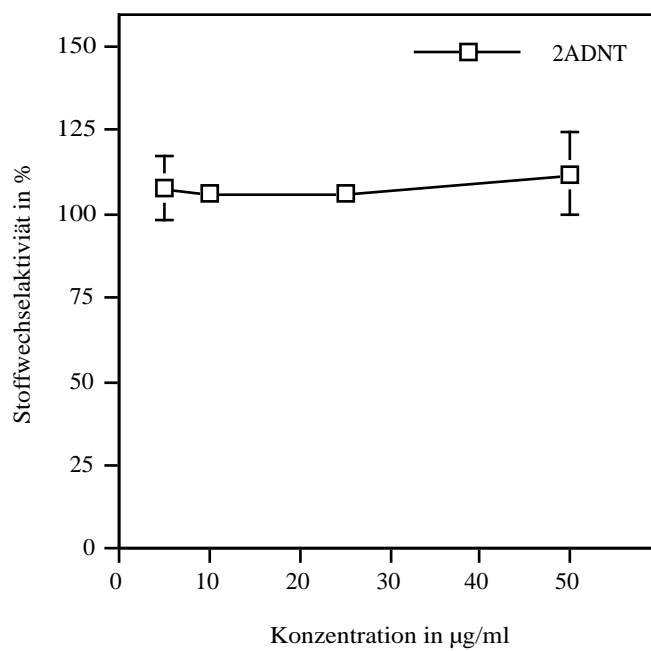
2-ADNT, 2,4-DNT, 4A-2,6-DNT und 2A-4,6-DNT. Als Kontrolle (K) diente eine Sechsfachbestimmung mit PBS<sup>def</sup> ohne Zugabe eines Nitroaromaten. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Monozyten in Kontakt mit den Nitroaromaten bei Zellkulturbedingungen wurde zu jedem Napf 10 µl frisch angesetztes Lucigenin (2.35 mM, *Sigma, Deisenhofen*) hinzugegeben und 15 weitere Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz wurde unmittelbar nach der Zugabe von 10 µl Zymosan (*Serva, Heidelberg*) im LUMIstar gestartet (30 Zyklen à eine Sekunde). Die Werte repräsentieren 9 unabhängige Messungen. Von drei verschiedenen Spendern wurde jeweils eine 3-fach Bestimmung durchgeführt. Jede einzelne Meßplatte galt als geschlossenes Experiment, in dem die Werte prozentual mit einer Kontrolle vom gleichen Spender ohne Nitroaromatenzusatz verglichen wurden. Der Mittelwert der negativen Kontrolle wurde als 0 %-ige Leuchthemmung (maximale Chemilumineszenz) festgelegt und in Bezug zu den Mittelwerten der jeweiligen Testfelder gesetzt. Zu jeder Einzelbestimmung wurde parallel der MTT Vitalitätstest mit identischem Versuchsansatz, zum Ausschluss letal-toxischer Einflüsse, mitgeführt. Die Abbildungen 0-10 bis 0-21 zeigen den deutlichen Einfluss der Nitroaromate auf die Produktion von Sauerstoffradikalen primärer humaner Monozyten. Die allgemeine Stoffwechselaktivität der Monozyten im MTT-Test blieb nahezu unbeeinflusst. Es folgt nun die Auswertung im Einzelnen für jeden untersuchten Nitroaromaten.

Trinitrotoluol (TNT) ist als stärkster Vertreter auf Rüstungsaltsstandorten sicherlich der wichtigste Nitroaromat. **Trinitrotoluol (TNT)** hatte einen stark dosisabhängigen Einfluss auf die Abgabe von Sauerstoffradikalen primärer humaner Monozyten nach der Aufnahme von Zymosan (Abb. 0-10). Bei der geringsten hier eingesetzten Dosis von 5,0 µg/ml über 24 Stunden kam es zu einer Leuchthemmung von fast 30 %. Die zeitgleiche Stoffwechselleistung im MTT-Test (Abb. 0-11) war nicht eingeschränkt, sondern auf 120% gegenüber der Kontrolle erhöht. Die 50 %-ige Leuchthemmung (ED<sub>50</sub>) war bei einer TNT-Konzentration von 10,0 µg/ml über 24 Stunden zu messen, bei zeitgleicher Stoffwechselaktivität von über 140%. Eine fast komplette Leuchthemmung wurde bei einer TNT-Konzentration von 50,0 µg/ml über 24 Stunden gemessen. Auch hier war die allgemeine Stoffwechselaktivität gegenüber der Kontrolle nicht vermindert. Der Testaufbau bot sich an, auch andere typische Metabolite von TNT zu analysieren. Zunächst wurden zwei primäre Metabolite, die häufig auch von einfachen Organismen aus TNT produziert werden können untersucht.

### Chemilumineszenz



### MTT-Test



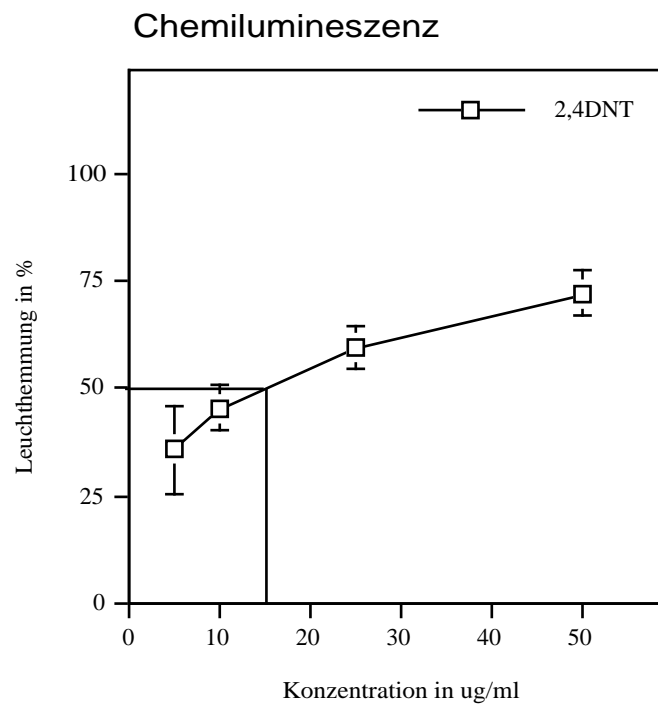


Abbildung 0-16

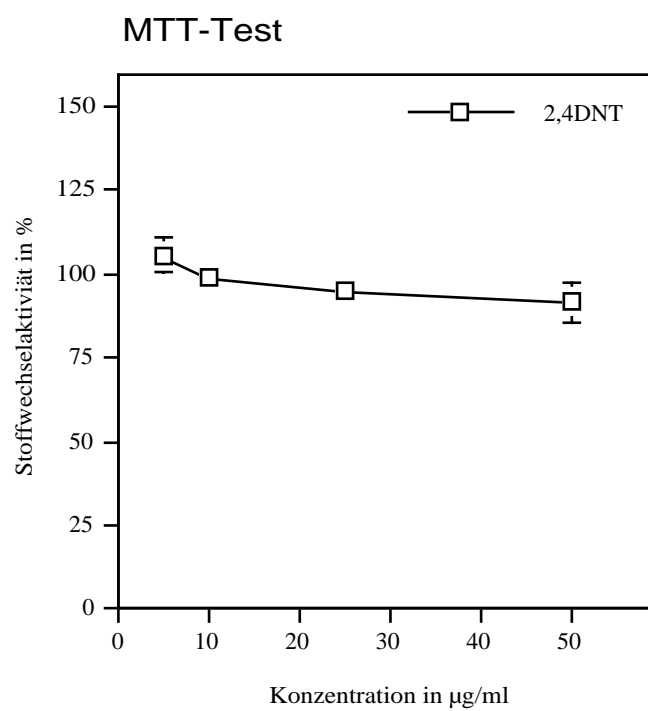


Abbildung 0-17



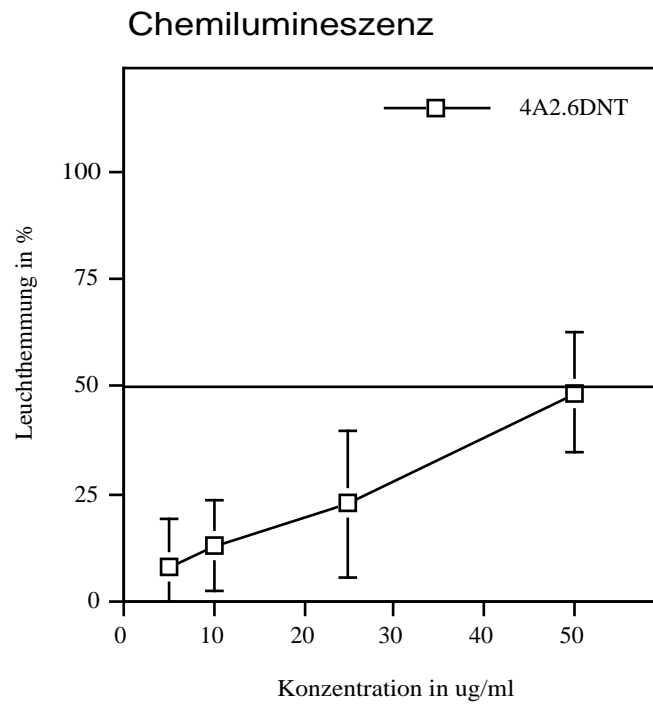


Abbildung 0-18

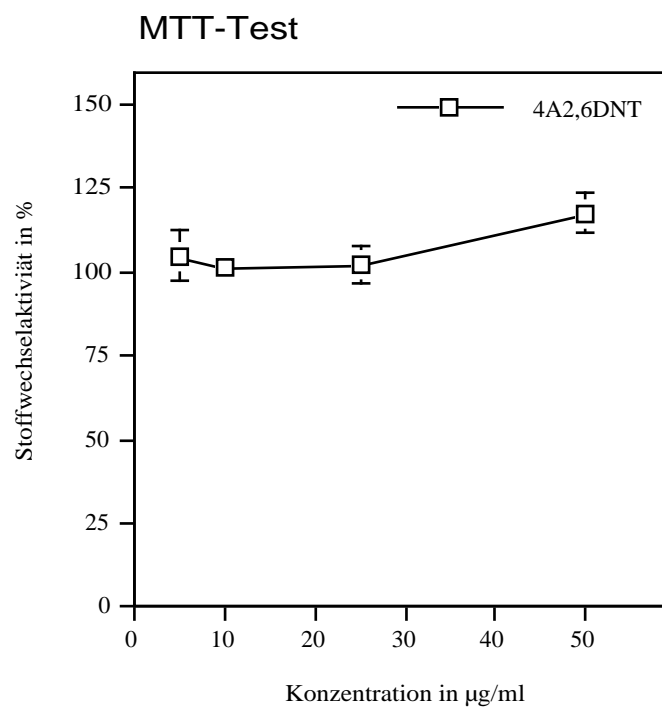


Abbildung 0-19

### Chemilumineszenz

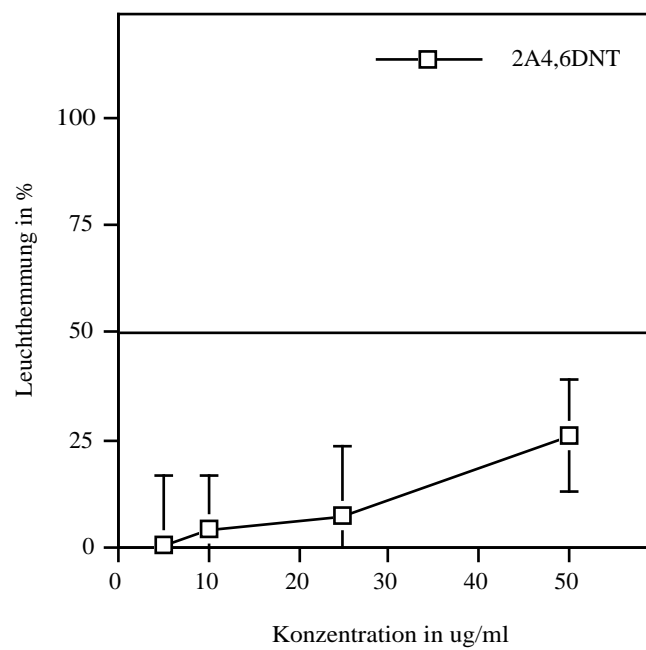


Abbildung 0-20

### MTT-Test

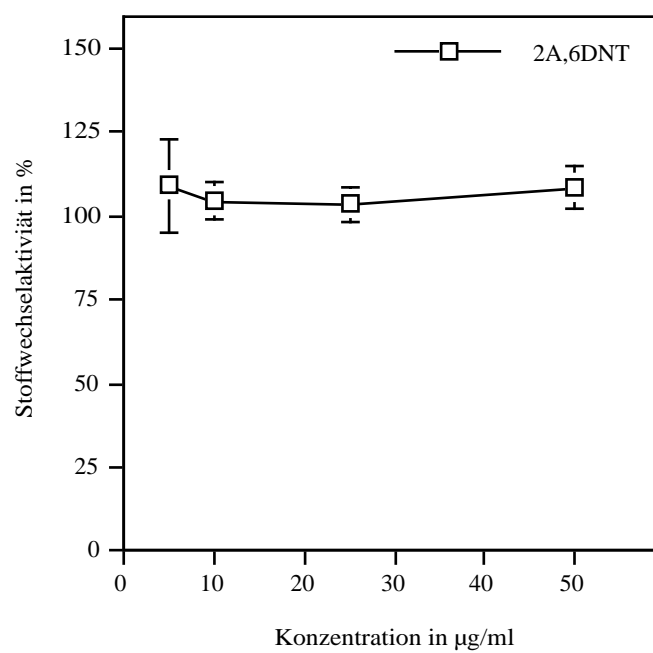


Abbildung 0-21

**4ADNT** führte zu einer dosisabhängigen Leuchthemmung (Abb. 0-12), bei einer dosisunabhängigen Stoffwechselleistung (Abb. 0-13) im beobachteten Dosisintervall von 5,0–50,0 µg/ml. Die  $ED_{50}$  für 4ADNT lag bei etwa 40,0 µg/ml. **2-ADNT** führte zu einer dosisabhängigen Leuchthemmung (Abb. 0-14) bei einer auf maximal 110 % erhöhten Stoffwechselleistung (Abb. 0-15). Eine  $ED_{50}$  lag bis 50 µg/ml nicht vor. Die maximale hier gemessene Leuchthemmung von etwa 40 % wurde bei der höchsten Konzentration von 50,0 µg/ml erreicht. Ein weiteres wichtiges Nebenprodukt, das auch häufig auf Rüstungsaltslasten vorkommt, ist 2,4-DNT. **2,4-DNT** verursachte bei steigender Dosis eine verstärkte Leuchthemmung (Abb. 0-16). 2,4-DNT wies von allen TNT Metaboliten die höchste Leuchthemmung auf, lag aber deutlich unter der Leuchthemmung von TNT bei gleicher Dosis. Die Leuchthemmung bei 5,0 µg/ml lag bereits bei 35 % und erreicht eine 70 %-ige Hemmung bei 50,0 µg/ml. Die  $ED_{50}$  liegt bei etwa 15,0 µg/ml 2,4-DNT. Die Stoffwechselaktivität (Abb. 0-17) blieb über den gesamten Bereich von 5,0 - 50,0 µg/ml 2,4-DNT nahezu unverändert bei 100 %. Zwei der seltener zu findenden Metabolite von TNT sind 2A-4,6DNT und 4A-2,6DNT. **4A-2,6-DNT** führte zu einer dosisabhängigen Leuchthemmung (Abb. 0-18), erreichte aber keine Leuchthemmung von 50 %. Die maximale Leuchthemmung lag bei 48 % bei der höchsten hier untersuchten Dosis von 50,0 µg/ml. Die Stoffwechselleistung (Abb. 0-19) lag über den gesamten Verlauf zwischen 100 bis 120 %. **2A-4,6-DNT** führte ebenso zu einer dosisabhängigen Leuchthemmung (Abb. 0-20). Die maximale Leuchthemmung lag bei 25 %. Die Stoffwechselleistung war im gesamten Dosisintervall gegenüber der negativen Kontrolle unbeeinflusst (Abb. 0-21). Alle hier untersuchten Substanzen führten bei steigender Dosis zu einer steigenden Leuchthemmung ohne Verminderung der Stoffwechselleistung. In einigen Fällen kam es dagegen eher zu einer im MTT-Test verstärkten allgemeinen Stoffwechselaktivität. Der Übersicht halber möchte ich die oben in den Grafiken dargestellten Daten abschließend tabellarisch zusammenfassen.

<i>Leuchthemmung [%] bei der Chemilumineszenzmessung</i>								
	<b>5,0 µg/ml</b>		<b>10,0 µg/ml</b>		<b>25,0 µg/ml</b>		<b>50,0 µg/ml</b>	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
<b>TNT</b>	29,8	5,9	52,8	5,9	89,2	16,2	99,3	1,0
<b>4ADNT</b>	15,6	5,6	26,1	8,6	39,2	4	58,3	4,5
<b>2ADNT</b>	6,2	5,9	17,6	5,5	30,1	3,9	42,1	5,3
<b>2,4-DNT</b>	35,8	10,3	45,4	5,4	59,3	5,1	72,1	5,2
<b>4A-2,6-DNT</b>	8,0	11,2	13,2	10,5	22,7	17,3	48,4	14,0
<b>2A-4,6-DNT</b>	0,7	16	4,1	12,4	7,6	15,7	25,9	12,9

Die abgedunkelten Felder zeigen Werte > ED<sub>50</sub> an.

<i>allgemeine Stoffwechselleistung [%] im MTT Test</i>								
	<b>5,0 µg/ml</b>		<b>10,0 µg/ml*</b>		<b>25,0 µg/ml*</b>		<b>50,0 µg/ml</b>	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
<b>TNT</b>	122,3	6,7	136,5	5,3	131,7	15,2	109,4	10,8
<b>4ADNT</b>	105,2	9,0	100,3	3,0	99,1	3,1	103,5	5,5
<b>2ADNT</b>	107,7	9,5	105,9	2,3	106,5	2,1	111,8	12,3
<b>2,4-DNT</b>	105,5	5,0	99,2	2,7	94,9	2,5	91,4	5,9
<b>4A-2,6-DNT</b>	104,6	7,6	101,3	3,5	102,3	5,7	117,6	5,9
<b>2A-4,6-DNT</b>	109,1	13,9	104,8	5,6	103,4	5,3	108,3	6,4

\*Anmerkung: die Werte für 10µg/ml und 25 µg/ml sind nur durch eine 6-fach Bestimmung repräsentiert

## Diskussion

Es ist schon lange bekannt, dass Nitroaromate, insbesondere TNT und seine Metaboliten, für Mensch und Tier toxisch sind (*Bruns-Nagel, D. 1993, Drzyzga, O. et al. 1994, Kraß, J.D. 1998, Honeycutt, M.E. et al. 1996, Tan, E. et al. 1992*). In der Vergangenheit wurde intensiv über die Bedeutung, Gefährdung und Entsorgung von Rüstungsmittelaltlasten geforscht. Eine Untersuchung von Nitroaromaten auf das menschliche Immunsystem wird in dieser Arbeit erstmals vorgestellt. In der Umwelthygiene und vergleichbaren Institutionen wird die mögliche Toxizität von Xenobiotika über beispielsweise den Wasserfloh (*Daphnia magna*) und seine Änderung des Bewegungsverhaltens bei verschiedenen Konzentrationen im Wasser getestet. Ein anderer vergleichbarer Test ist die Biolumineszenz von *Vibrio fischeri*. Bei zunehmender Toxizität für *Vibrio fischeri* wird die Leuchtintensität schwächer. Als weiterer klassischer Untersuchungsweig ist die Abschätzung der Mutagenität von Fremdstoffen zu nennen. Ein weit verbreiteter Test ist der Ames-Test (*Ames et al. 1973*), der die Mutation von *Salmonellen* (*S. typhimurium*) mit zu testenden Substanzen untersucht. Bei vielen Verdachtsäußerungen zur Mutagenität versucht man, durch Substanzähnlichkeiten auf mögliche gemeinsame Wirkungsprofile hinzuweisen.

Alle diese Testsysteme und Untersuchungen haben gemeinsam, dass nicht direkt an menschlichen Modellsystemen gearbeitet wird, sondern die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden. Wie groß die Schwierigkeiten sein können zeigt der Vergleich von der LD<sub>50</sub> für Ratten (795 mg/kgKG) und Mäusen (669 mg/kgKG) gegenüber TNT. Selbst bei so ähnlichen Säugern ist die Empfindlichkeit gegenüber TNT doch deutlich verschieden. Die einzige Veröffentlichung, die das Zusammentreffen von immunologischen Zellen und Nitroaromaten untersucht, kommt von Tierfelder und Noel Masihi (*Thierfelder, W. und Noel Masihi, K., 1995*), die die toxische Wirkung von TNT-Metaboliten auf Milzsuspensionszellen der Ratte untersuchten. Eine klassische Quelle für immunologischen Zellen bei Ratten und Mäusen ist die Milzsuspension, denn sie stellt ein Gemisch aus T- und B-Zellen und einigen Monozyten/Makrophagen dar. In der hier vorgestellten Arbeit wird mit aufgereinigten Monozyten/Makrophagen gearbeitet, entweder als Zelllinie Mono Mac 6 oder mit primären humanen Monozyten aus dem peripheren Blut. Die Daten sind daher leider nur begrenzt vergleichbar. Als wichtiger Baustein des menschlichen Immunsystems eignen sich Monozyten als ausgewählte

Zellgruppe ausgezeichnet, da Monozyten unter anderem Substanzen aktiv aufnehmen bzw. phagozytieren können (*Gemsa et al.* 1997).

Monozyten gehören zu den mononukleären phagozytischen Zellen des menschlichen Körpers und in erster Linie zur unspezifischen Immunabwehr, aber sie vermitteln auch Reaktionen für die spezifische Abwehr als Antigen-präsentierende Zellen (*Gemsa et al.* 1997). Die Monozyten des peripheren humanen Blutes haben im allgemeinen bei Gesunden noch keinen Antigenkontakt, sondern erst dann, wenn sie in den Geweben zu Makrophagen ausdifferenzieren. Die Stellung zwischen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr, mit regulativen Aufgaben und Fähigkeiten zur aktiven Substanzaufnahme, macht diese Zellgruppe für die Untersuchung von TNT und seinen Metaboliten hervorragend geeignet. Beim Aufbau eines Testsystems zur Bestimmung der Immuntoxizität von Fremdstoffen setzten wir auf die Möglichkeit der Monozytenzelllinie Mono Mac 6. Wie zuvor von Ziegler-Heitbrock (*Ziegler-Heitbrock et al.*, 1988) beschrieben, unterscheidet sich die humane Tumorzelllinie nur geringfügig von primären Monozyten. Beim Aufbau des Testsystems zur Phagozytose von Zymosan und Messung der Abgabe von Sauerstoffradikalen waren die mit Mono Mac 6 erreichbaren Werte unter der Messschwelle des Geräts.

Mit dem Wissen einer Spenderdivergenz entschieden wir uns zur Arbeit mit primären Monozyten von gesunden Blutspendern. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion dieser Zellpopulation war ausgezeichnet nach Zymosanphagozytose. Um trotzdem die Werte vergleichbar zu machen, wurde eine relative Betrachtung der Einzelmesswerte eines Spenders als geschlossenes System gewählt.

Zur Gewinnung von Monozyten aus peripherem Blut gibt es viele Möglichkeiten. Eine klassische Methode ist die kurzfristige Adhärenz der Monozyten am Boden von Kulturschalen. Die restlichen PBMC werden als nichtadhärente Zellen durch Waschen entfernt. Die Zahl der so gewonnen Monozyten ist jedesmal so verschieden, dass eine solche Aufreinigungsmethode hier nicht geeignet erschien. Weitere Methoden zur Aufreinigung von Monozyten aus PBMC ist das FACS-Sorting mit positiver und negativer Selektion durch geeignete Antikörper, ähnlich die Aufreinigung über eine Zellmarkierung mit Antikörper und Metallkügelchen und anschließender Selektion über ein Magnetfeld. Hier haben wir uns für die Elutriation nach einer Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation entschieden, da die erreichte Reinheit von ca. 95 % Monozyten sehr schonend und ohne Einwirkung von Antikörpern möglich ist.

## ***Toxizität von TNT auf menschliche Monozyten***

In den ersten Jahren nach Erfindung von TNT hielt man diese Substanz für völlig ungiftig, dann aber lassen sich Berichte aus der Sprengstoffproduktion über letal-toxische Auswirkungen auf den Menschen finden (1911-1915; 279 Tote). Die Betroffenen waren in erster Linie Arbeiter aus der Produktion und der Abfüllung von TNT. Berichte über Umweltschäden sind nicht bekannt. In der Rüstungsindustrie des Zweiten Weltkrieges sind vielfältige Berichte von leichten bis tödlichen Intoxikationen bekannt. Als Intoxikationsmodus werden neben der Inhalation von nitroaromathaltigen Stäuben die Aufnahme von TNT über die Haut genannt (nach *Martinetz, D. und Rippen, G.* 1996). Regelmäßig gibt es Berichte über Gelbverfärbungen von Haut und Haaren und Auftreten von Müdigkeit und Schwäche. Neben der Toxizität ist die Frage nach einer Kanzerogenität von TNT von großem allgemeinem Interesse. Die in Tierversuchen an Hunden, Ratten und Mäusen ermittelten Grenzwerte als Lebenszeitrisko liegen bei einer Risikoakzeptanz von  $10^{-6}$  bei 33 ng/kg/d für den Menschen (*Martinetz, D. und Rippen, G.* 1996). Bei einem 70 kg schweren Menschen bedeutet das, dass bei 2,1 µg TNT/Tag keine Mutationen zu erwarten sind.

Hier kann auf den wichtigen Aspekt der Kanzerogenität nicht weiter eingegangen werden, da das Hauptaugenmerk auf der Toxizität von TNT und seinen Metaboliten lag. Neben dem eigenen Aufbau des Immunotoxsystems war es wichtig, zuerst mit bekannten Toxizitätstesten zu arbeiten, um später die Ergebnisse vergleichen zu können. In dieser Arbeit wurden verschiedene Vitalitätsteste für Monozyten eingesetzt.

Der Trypanblau-Test ist ein globaler Test, der durch die Blaufärbung toter und Nichtanfärbung lebender Zellen eine Differenzierung in tote und lebende Zellen ermöglicht (*Toni Lindl und Jörg Bauer, 1989*). Um vergleichbare Zahlen mit ausreichender Genauigkeit zu erzielen, werden mindestens 2 x 300 Zellen pro Ansatz bestimmt. Tote Monozyten können nur als solche angesprochen werden, wenn sie noch ihre äußere zelltypische Form haben. Kleinere Zellfragmente bzw. Zellpartikel können nicht in die Bewertung mit einbezogen werden. Wenn Zellen sterben, gibt es zwei grundsätzliche Mechanismen: Apoptose und Nekrose. In beiden Fällen kommt es aber im Laufe der Zeit zu Zellfragmenten, die keinen Rückschluss auf die ursprüngliche Zellzahl zulassen. Der Trypanblau-Test lässt nur die Aussage lebend oder tot zu. Eine Einteilung in Übergangsstufen ist nicht möglich.

Als technisch und funktionell verschiedener Test wurde der EZ4U-Test durchgeführt. Der EZ4U-Test basiert auf der Umsetzung von gelbem Substrat in blaues Formazan. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wird der Anteil an gebildetem Formazan photometrisch gemessen. Der Test stellt einen Summenwert der allgemeinen Stoffwechselleistung aller untersuchten Zellen dar (*EZ4U-Produktinformation*). Der Grad der Substratumsetzung ist proportional zur Vitalität der untersuchten Zellen. Dem Test liegt zugrunde, dass eine tote Zelle keine Stoffwechselvorgänge mehr haben kann und lebende Zellen Substrat in blaues Formazan umsetzen können. Es ist sehr gut möglich, auch schon Einschränkungen der Stoffwechselleistung zu erfassen. Ob die untersuchten Zellen neben der allgemeinen Stoffwechselproduktion auch noch für sie charakteristische Funktionen (z.B. Phagozytose) ausführen können, bleibt offen. Trotz der unterschiedlichen Methodik zeigen beide Teste eine toxische Grenze von 5,0-10,0 µg/ml TNT für Mono Mac 6 nach 24 – 48 Stunden Inkubation. Vergleicht man die Werte für Mono Mac 6 mit Werten aus der Literatur, so findet man ähnliche Dosisangaben bei Chinesischen Hamsterovarienzellen (LD<sub>50</sub>: 24 µg/ml TNT) und Rattenleberzellen (LD<sub>50</sub>: 4 µg/ml TNT) (*Honeycutt, M. E. et al.* 1996) -siehe auch die umfangreiche tabellarische Zusammenfassung von Literaturwerten in der Einleitung-.

Ein dem EZ4U-Test verwandter Test ist der MTT-Test, auch hier wird ein gelbes Substrat in blaues Formazan umgesetzt. Der MTT-Test mit primären Monozyten zeigt trotz des ähnlichen Testsystems zum EZ4U-Test kaum Stoffwechseleinbußen, auch bei hohen TNT-Dosen. Vergleicht man die Daten von Abb.0-3 und Abb. 0-4, so ist allerdings nur der 24 Stunden Wert vergleichbar. Hier zeigt der EZ4U-Test eine deutlich geringere Stoffwechselaktivität der Mono Mac 6 unter TNT-Einfluss als die primären Monozyten im MTT-Test. Die Leuchthemung der primären Monozyten entspricht allerdings sehr wohl dem toxischen Dosisintervall der Mono Mac 6 im EZ4U-Test in Abb. 0-10.

Nach den verschiedenen in vitro -Testsystemen ist aber letztlich entscheidend, ob die für Monozyten/ Makrophagen toxische Dosis beim Menschen erreichbar ist. Die Resorption für TNT liegt nach 8 Stunden bei 2,6-3,8 µg/ml pro cm<sup>2</sup> Hautoberfläche, dazu können noch Inhalation und Ingestion kommen und damit durchaus relevante Mengen an TNT, um toxisch auf Monozyten/ Makrophagen zu wirken. Die geschätzte tägliche Aufnahme lag zu Beginn des Jahrhunderts unter geringen Arbeitsschutzmaßnahmen für Haut und Atemorgane sogar bei 25 mg (*Martinetz, D. und Rippen, G.,* 1996). Unter Altlastengesichtspunkten spielt die Ingestion über



das Trinkwasser und Pflanzen wahrscheinlich die größte Rolle. Nitroaromate können im Wasser gelöst vorkommen, als Stäube eingeatmet bzw. direkt oral aufgenommen werden (*McKone T.E., Daniels J.I., 1991*). Eine weitere Möglichkeit besteht über den Anbau von Nutzpflanzen auf belastetem Boden. Nitroaromate konnten auch im untersuchten Pflanzenmaterial selbst festgestellt werden. Im Rahmen der heute üblichen Trinkwasseraufbereitung liegen die Grenzwerte deutlich unter der für Monozyten toxischen Konzentration (0,1 µg/ml TNT, Summenwert für Nitroaromaten: 0,5 µg/ml, *Wolff, H.J., 1998*). Unter so kontrollierten Bedingungen sollte eine Intoxikation nur schwer vorstellbar sein. Die Möglichkeit einer Akkumulation von TNT oder anderen Nitroaromaten ist nicht ausgeschlossen, aber noch nicht untersucht. Bisher gibt es aber in einigen Berichten den Nachweis von Reduktionsprodukten im Urin, nach Inkorporation von TNT, bei Arbeitern (*Ahlborg, G. Jr., et al. 1988, Neumann, H.-G. 1996*). Eine Bilanzierung von aufgenommenem und ausgeschiedenem TNT beim Menschen konnte – verständlicherweise – nicht durchgeführt werden.

### ***Metabolisierung von TNT durch menschliche Monozyten***

Es konnte gezeigt werden, dass TNT von menschlichen Monozyten zu 4-ADNT und 2-ADNT reduziert wird. Diese Versuchsanordnung überprüfte ausschließlich die Metabolisierung von TNT durch Monozyten/ Makrophagen. Über Körperzellen mit ähnlichen Eigenschaften kann keine Aussage gemacht werden. Es gibt keine Hinweise aus der Literatur für andere menschliche Zellen. Der einzige Hinweis, dass im menschlichen Körper TNT zu 4-ADNT und 2-ADNT reduziert wird, ergibt sich aus Urinuntersuchungen von TNT-Arbeitern. In der Literatur finden sich andere Untersuchungen zur Metabolisierung von TNT durch tierische und pflanzliche Organismen (*Walker J.E. und Kaplan D.L. 1992*). Das Metabolitenspektrum, in das TNT von Mikroorganismen aufgeschlüsselt werden kann, ist vielfältig. Es wird weltweit versucht, Pilze, Bakterien und Pflanzen gezielt als biologische Sanierungsmöglichkeiten für TNT-belastete Böden einzusetzen (*Bruns-Nagel, D. et al. 1998, Breitung, J. et al. 1995*).

In den hier vorgestellten Experimenten konnte eine chemische Reaktion zwischen Zellkulturmedium und TNT ausgeschlossen werden. In Kontrollen ohne Zellen unter identischen Kulturbedingungen blieb TNT über den gesamten Beobachtungsraum von 72 Stunden im Medium gelöst und lag als TNT unverändert vor. Metabolite konnten nicht gemessen werden.

Vergleicht man die Versuchsansätze bei 2,0 µg/ml TNT mit und ohne Monozyten, dann war der Effekt der Metabolisation durch die Zellen sehr deutlich zu erkennen. TNT wurde kontinuierlich durch die Monozyten zu 4ADNT und 2ADNT reduziert. In der Bilanz der Nitroaromaten vor TNT-Zugabe und nach 72 Stunden fällt ein kleiner Verlust an Nitroaromaten auf. Es ist denkbar, aber letztlich nicht geklärt, dass ein Teil der Nitroaromaten sich der HPLC-Analyse dadurch entzieht, dass dieser Teil von den Zellen aufgenommen und somit intrazellulär vorliegt. Zur HPLC-Analyse wurden aber ausschließlich Zellkulturüberstände analysiert. Die Versuche, den verbleibenden Nitroaromatenrest aus den Zellen zu lösen, scheiterte an den extrem geringen Mengen. Konjugate wurden nicht detektiert. Die Frage bedarf sicher noch weiterer Untersuchungen, ggf. auch mit der Frage verknüpft, in welchem Zellkompartiment die Nitroaromaten zu finden sein könnten. Mittels Gefriertrocknung und anschließender Methanolausschüttlung des zellulären Anteils konnten zwar Reduktionsprodukte in geringer Menge nachgewiesen werden, eine Bilanzierung war aber auf Grund der sehr kleinen Substanzmengen nicht möglich. Ein denkbarer Ansatz wäre eine Bilanzierung über eine radioaktive Markierung von Trinitrotoluol mit C<sup>14</sup> oder N<sup>15</sup> (Drzyzga, O., et al. 1999).

### ***Die Chemilumineszenz von primären humanen Monozyten unter dem Einfluss von TNT und andere Nitroaromaten***

Die Chemilumineszenz ist eine schon ca. 3500 Jahre alte Beobachtung, die auch schon von Aristoteles beschrieben wurde. Das Phänomen von kaltem Leuchten, meist in einem Wellenbereich von 400-700 nm, lässt sich allerdings erst durch technische Entwicklungen der letzten Jahre ausreichend genau messen und quantifizieren (Albrecht, S. et al. 1990). In dem gezeigten Versuchsaufbau macht man sich eine physiologische Reaktion von Monozyten gegenüber Wandbestandteilen von *Candida albicans* (Zymosan) zunutze (Lilius E. M. und Waris M. 1984). Zymosanpartikel werden von Monozyten erkannt und aufgenommen, anschließend geben Monozyten als Reaktion neben TNF $\alpha$  (Amann, S. 1996) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Sauerstoffradikale an ihre Umgebung ab (Labsystems 1993). Um die Freisetzung von Sauerstoffradikalen quantitativ auswertbar zu machen, wird Lucigenin als Verstärkersubstanz eingesetzt. 2,35 mM

Lucigenin (bis-N-Methylacridiniumnitrat) verstärkt die NADPH-Oxidase abhängige Chemilumineszenz von Sauerstoffradikalen proportional um den Faktor  $10^3$  bis  $10^4$  (*Labsystems* 1993).

Für die Chemilumineszenzmessung wurden primäre humane Monozyten von gesunden Blutspendern eingesetzt. Mono Mac 6 eigneten sich hierfür nicht, da die Reaktion gegenüber Zymosan unterhalb des meßbaren Bereichs lag. Der Nachteil der primären Monozyten liegt in der Schwierigkeit, verschiedene Blutspender direkt miteinander vergleichen zu können. Dieser Umstand zwang uns, die einzelnen Messwerte eines Blutspenders in seinem geschlossenen System relativ aufeinander zu beziehen. Sechs Ansätze ohne Nitroaromaten, aber ansonsten identischen Versuchsbedingungen stellten die Monozytenfunktion ohne Leuchthemmung gegenüber Zymosan vor. In Vorversuchen konnte regelmäßig gezeigt werden, dass unter Nitroaromateneinfluss eine Abschwächung der Leuchtkraft als Ausdruck der verminderten Sauerstoffradikalproduktion auftrat. Die relativen Veränderungen der Chemilumineszenz- und der Vitalitätsmessung der Einzelpersonen wurden anschließend mit denen anderer Blutspender verglichen. Der Versuchsansatz ist auf andere wasserlösliche Xenobiotika leicht übertragbar und ermöglicht eine Abschätzung der Wirkung auf Monozyten, eine wichtige immunologische Zellpopulation (*Bruns-Nagel, D. et al.* 1999). Zum Vergleich der Wirkung der Substanzen auf die Monozyten/ Makrophagen, ist die Angabe der effektiven Dosis ( $ED_{50}$ ) für eine 50%-ige Leuchthemmung geeignet. In der folgenden Tabelle sind die  $ED_{50}$  Werte für alle untersuchten Nitroaromate zusammengestellt.

**Leuchthemmung als  $ED_{50}$  für verschiedene Nitroaromate  
bei primäre humanen Monozyten nach 24 Stunden Inkubation**

TNT	8,0 µg/ml
2,4-DNT	15,0 µg/ml
4-ADNT	38,0 µg/ml
4-acetyl-2,6-DNT	50,0 µg/ml
2-ADNT	>50,0 µg/ml
2-acetyl-4,6-DNT	>50,0 µg/ml

Auffällig ist, dass bereits 8 µg/ml TNT und 15 µg/ml 2,4-DNT für eine 50 % Leuchthemmung sorgen. Die anderen untersuchten Substanzen mußten in Konzentrationen von mindestens 38 µg/ml 4ADNT oder mehr als 50 µg/ml 2ADNT, 4-Acetyl-2,6-DNT oder 2-Acetyl-4,6-DNT über 24 Stunden vorliegen, um eine vergleichbare Leuchthemmung zu erreichen.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Testsystem untersuchte erstmals die direkte Wirkung von TNT und von TNT-Metaboliten auf die Funktion menschlicher Zellen. Im Vergleich mit dem Vitalitätstest (Trypanblau-Test) und dem Stoffwechseltest (EZ4U) war die Messung der stimulationsabhängigen Sauerstoffabgabe ein empfindlicheres und den anderen überlegeneres Testsystem.

Beim Vitalitätstest kann ausschließlich ermittelt werden, ob die untersuchte Zellpopulation im untersuchten zeitlichen Intervall überlebt oder nicht. In einer Kinetik ist es möglich, eine sehr gute Zeit-Dosiswirkung zu erarbeiten. Der Vitalitätstest ist gut geeignet, um die grundsätzliche Frage einer letal-toxischen Wirkung auf Zellen oder Organismen zu testen. Ob die untersuchten Zellen einen Schaden erleiden, der nicht letal aber ihre Funktion verändert, kann nicht ermittelt werden.

In einer allgemeinen Stoffwechseluntersuchung von Zellen unter Einfluss von Fremdstoffen kann man untersuchen, ob neben der letalen Wirkung der untersuchten Substanz auch eine allgemeine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion besteht. Ohne funktionierende Mitochondrien kann eine menschliche oder tierische Zelle nicht überleben. Diese Testsysteme (EZ4U und MTT) können neben der möglichen letalen Wirkung von Fremdstoffen auch etwas über die Wirkung von Substanzen auf die allgemeine Stoffwechselfunktion sagen. Eine Schädigung der allgemeinen Stoffwechselfunktion der Zelle ist in der Regel aber auch mit deutlichen Einbußen der geregelten Funktion der Zelle verbunden, nicht aber zwingend mit dem Tod der Zelle. Welche Funktionen beeinträchtigt sind, bleibt offen.

Mit dem hier vorgestellten Testsystem, das gezielt eine typische, die Zelle charakterisierende Funktion untersucht, konnten wir zeigen, dass bereits die stimulationsabhängige Sauerstoffabgabe von menschlichen Monozyten/ Makrophagen gestört war, obwohl im MTT-Test kaum ein Einfluss auf die allgemeine Stoffwechsellaage zu messen war.

Das hier vorgestellte System unterscheidet sich auch wesentlich von dem von Thierfelder und Masihi (*Thierfelder, W. und Noel Masihi, K 1995*). Dort wurde mit einer Zellsuspension aus Rattenmilz gearbeitet wurde, in der hier vorgestellten Arbeit dagegen mit menschlichen Mo-

nozyten hoher Reinheit. Thierfelder und Mashihi stellten in ihrer Arbeit fest, dass Aminotoluole (Triaminotoluol, Diaminotoluol) die Chemilumineszens stärker einschränken als Aminonitrotoluole. TNT oder DNT wurden dort nicht untersucht.

Das Immuntoxizitäts-Testsystem zeigte erstmals den Einfluss von TNT und TNT-Metaboliten auf die Funktion der stimulationsabhängigen Sauerstoffradikalabgabe von menschlichen Monozyten/ Makrophagen. Das hochempfindliche Meßsystem ist dem Vitalitätstest und Stoffwechseltest in der Beurteilung funktioneller Einflüsse auf Monozyten/ Makrophagen durch Fremdstoffe überlegen.

Die standardisierten und empfohlen Testsysteme zur Abschätzung der möglichen Gefahren für den Menschen werden meist an Mikroben oder anderen nicht-humanen Zellkultursystemen durchgeführt. Eine Übertragung von im nicht-humanen System gewonnener Daten auf den Menschen ist nur eingeschränkt möglich. An diesem Punkt sehen wir in der Zukunft große Möglichkeiten für Testsysteme mit humanen Zellen. Dabei bieten sich insbesondere die Zellen des Immunsystems an, denn sie können durch etablierte Verfahren gut und rein gewonnen werden und repräsentieren nicht zuletzt eine für die Integrität des Menschen sehr entscheidene Zellgruppe.

## Zusammenfassung

Rüstungsmittelaltlasten sind ein klassisches Beispiel für eine vom Menschen produzierte Altlast, die früher sorglos und ohne Rücksicht auf mögliche Folgen für die Umwelt gehandhabt wurde. Das Bewusstsein und das Wissen um die Gefahren solcher Fremdstoffe nimmt inzwischen zu. Die ersten Arbeiten waren die Standorterfassung und das Abschätzen der Gefahren für Boden, Luft und Wasser. Es wurden inzwischen einige Testverfahren zur Abschätzung der Mutagenität und Toxizität des Sprengstoffs Trinitrotoluol (TNT) und seiner Metabolite auf Mikroorganismen und Kleinlebewesen etabliert. Eine direkte Wirkung von Nitroaromaten auf den Menschen konnte nur aus Arbeitsunfällen und historischen Berichten aus den frühen Jahren der ohne besonderen Arbeitsschutz durchgeführten Produktion geschlossen werden. In den letzten 20 bis 30 Jahren stieg die Aufmerksamkeit, bedingt auch durch dramatische Berichte über andere Gifte in der direkten Lebensumgebung, und es entstand ein berechtigtes Bedürfnis nach Aufklärung der Auswirkungen von Rüstungsmittelaltlasten auf die Gesundheit. Es gibt über TNT Untersuchungen, die ein statistisch erhöhtes Leukämierisiko für den Menschen zeigen, andere zeigen einen Einfluss auf den Sauerstofftransport im Blut (Methämoglobinämie) und in chinesischen Veröffentlichungen wird der Einfluss auf die Libido und Spermienbeweglichkeit beschrieben.

In dieser Arbeit wurde ein völlig neuer Zugang gewählt. Grundlage dieser Arbeit war die Etablierung eines Testsystems, das die natürliche Funktion von menschlichen Zellen des Immunsystems unter Einfluss von Trinitrotoluol und seinen Metaboliten untersucht. Die Richtung der Untersuchung war also nicht, vom Symptom auf mögliche Ursachen zu schließen, sondern über einen repräsentativen experimentellen Aufbau die direkte Wirkung von TNT auf die Funktion von humanen Monozyten zu testen.

In dieser Arbeit konnte mit drei verschiedenen Testsystemen gezeigt werden, dass TNT und seine Metabolite in einer im menschlichen Organismus erreichbaren Konzentration für humane Monozyten/ Makrophagen toxisch sind.

Die Monozytenzelllinie Mono Mac 6 wurde mit TNT-Konzentrationen von 0,1 µg/ml bis 10,0 µg/ml *in vitro* unter optimalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach 3, 12, 24 und 48 Stunden wurde im Sinne einer Kinetik die Vitalität der Mono Mac 6 überprüft. In der klassischen Trypanblau-Färbung konnte sehr deutlich ein Zusammenhang zwischen der TNT-

Konzentration und der Inkubationsdauer gezeigt werden. Nach einer sehr kurzen Inkubation von 3 Stunden war der Effekt von TNT auf die Vitalität von Mono Mac 6 in allen untersuchten TNT-Konzentrationen sehr gering und kein Unterschied innerhalb der TNT-Konzentration darstellbar. Nach 12 Stunden Inkubation mit TNT konnte im hohen Konzentrationsbereich von mehr als 5 µg/ml TNT eine deutlich Verminderung lebender Mono Mac 6 nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden Inkubation unter TNT war eine deutliche Reduktion des Anteils lebender Monozyten feststellbar: Bei der höchsten Dosierung von 10 µg/ml waren weniger als 50 % der Mono Mac 6 lebend, bei einer Konzentration von 5 µg/ml TNT 56 %, bei 2,5 µg/ml TNT 66 % und bei weniger als 2,5 µg/ml etwa 80 %. In der Trypanblau-Färbung wurde eine LD<sub>50</sub> von 10 µg/ml TNT nach 48 Stunden ermittelt.

Die mit der Trypanblau-Methode erstellten Toxizitätsdaten ließen sich durch Messung der Stoffwechselleistung der Mono Mac 6 im EZ4U-Test reproduzieren. Der EZ4U-Test bestimmt, ähnlich dem MTT-Test, die Stoffwechselaktivität der Zellen aus der Menge des neu gebildeten Formazans aus einem nichttoxischem Chromophor.

Bereits nach 3 Stunden Inkubation mit TNT war bei der höchsten untersuchten TNT-Konzentration von 10 µg/ml eine Abschwächung der Stoffwechselleistung festzustellen. Nach 3 Stunden wurden noch 69 %, nach 24 Stunden 32 % und nach 48 Stunden nur noch 16 % der Stoffwechselleistung gemessen. Bei einer TNT-Konzentration von 5 µg/ml war der Einfluß auf die Stoffwechselleistung weniger stark ausgeprägt. Nach 3 Stunden lag die Stoffwechselleistung bei 5 µg/ml bei 89 %, nach 24 Stunden bei 64 % und nach 48 Stunden bei 32 %. Bei geringeren TNT-Konzentrationen von weniger als 1 µg/ml TNT konnte erst nach 48 Stunden eine Reduktion der Stoffwechselleistung gemessen werden. Für die Stoffwechselleistung unter TNT-Einwirkung ließ sich eine ED<sub>50</sub> von 5 µg/ml TNT nach etwa 36 Stunden ermitteln. Bei einer höheren TNT-Konzentration von 10 µg/ml wurde die ED<sub>50</sub> im EZ4U-Test nach etwa 20 Stunden Inkubation erreicht.

In einem dritten Testverfahren wurde die spezielle Funktionsfähigkeit von Monozyten/ Makrophagen untersucht. In dem in dieser Form erstmals vorgestellten Funktionsfähigkeitstest mit primären humanen Monozyten/ Makrophagen wurde die Phagozytosefähigkeit der Zellen bei verschiedenen Nitroaromatenkonzentrationen überprüft. Eingesetzt wurden TNT und einige Metabolite von TNT. Der Test basiert auf der Messung der konsekutiven Sauerstoffradikalabgabe der Monozyten/ Makrophagen auf einen standardisierten Reiz mit Partikeln von

*Candida albicans* (Zymosan). Die Sauerstoffradikalabgabe wurde mit Lucigenin verstärkt und als Chemilumineszenz gemessen.

Unter dem Einfluss von TNT wurde eine 50 %ige Reduktion der Sauerstoffradikalabgabe nach 24 Stunden Inkubation mit 8 µg/ml TNT festgestellt. Kein anderer hier untersuchter Nitroaromat zeigte auf die primären humanen Monozyten/ Makrophagen eine so starke Reduktion der Sauerstoffradikalabgabe. Bei einem wichtigen TNT-Metaboliten, dem 2,4 DNT, wurde eine 50 %ige Einschränkung der Chemilumineszenz bei einer Konzentration von 15 µg/ml nach 24 Stunden Inkubation ermittelt. Die weiteren untersuchten Metabolite von TNT hatten erst bei höheren Konzentrationen eine Einschränkung der Sauerstoffradikalabgabe bis auf 50 % nach 24 Stunden Inkubation zur Folge: 4-ADNT = 38,0 µg/ml; 4-Acetyl-2,6-DNT = 50,0 µg/ml; 2-ADNT >50,0 µg/ml; 2-Acetyl-4,6-DNT >50,0 µg/ml. Die parallel durchgeführten MTT-Tests mit den gleichen primären humanen Monozyten/ Makrophagen zeigten keine signifikante Einschränkung der allgemeinen Stoffwechselaktivität innerhalb der untersuchten 24 Stunden Inkubation mit Nitroaromaten. Die allgemeine Stoffwechselleistung im MTT-Test lag in allen Fällen über 90 %. Somit ist die Messung der stimulationsinduzierten Sauerstoffabgabe ein hochempfindliches und den Vitalitäts- und Stoffwechseltesten überlegenes Testsystem.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Immunotoxizitätstestsystem entwickelt und an TNT und einigen Metaboliten getestet werden. In Zukunft wird es bei der Komplexität der chemischen Substanzen immer wichtiger werden, auf eine große Bandbreite von Untersuchungsmöglichkeiten zur Abschätzung von Gefahren auf den Menschen und seinen Lebensraum zurückgreifen zu können. Heute stehen uns ausgezeichnete Analysemethoden zur Bestimmung und Quantifizierung vielfältiger Substanzen zur Verfügung, hier ist insbesondere die Gaschromatografie und HPLC zu nennen. Die nötige Ergänzung zu diesen chemischen und molekularen Methoden stellen funktionelle Testsysteme dar, die das Reaktionsmuster der Zellen reflektieren.

Die standardisierten und empfohlen Testsysteme zur Abschätzung der möglichen Gefahren für den Menschen werden meist an Mikroben oder anderen nicht-humanen Zellkultursystemen durchgeführt. Eine Übertragung von im nicht-humanen System gewonnener Daten auf den Menschen ist nur eingeschränkt möglich. An diesem Punkt sehen wir in der Zukunft große Möglichkeiten für Testsysteme mit humanen Zellen. Dabei bieten sich insbesondere die



Zellen des Immunsystems an, denn sie können durch etablierte Verfahren gut und rein gewonnen werden und repräsentieren nicht zuletzt eine für die Integrität des Menschen sehr entscheidene Zellgruppe.

## Literaturverzeichnis

- Ahlborg, G. Jr, Ulander A., Bergstrom B., Oliv A.** (1988): Diazo-positive metabolites in urine from workers exposed to aromatic nitro-amino compounds. *Int Arch Occup Environ Health*, 1988; 60 (1): 51-4
- Albrecht, S., Brandl, H., Adam, W.** (1990): Chemilumineszenz-Reaktion, Anwendungen in der klinischen Chemie, Biomedizin und Medizin. *Chemie in unserer Zeit* / 24. Jahrgang 1990 /Nr.5 VCH Verlagsgesellschaft
- Albrecht, S., Brandl, H., Adam, W.** (1990): Chemilumineszenz-Reaktion, Anwendungen in der klinischen Chemie, Biomedizin und Medizin. *Chemie in unserer Zeit* / 24. Jahrgang 1990 /Nr.5 VCH Verlagsgesellschaft
- Amann, S.** (1996): Morphologische und funktionelle Untersuchungen zur Rolle interstitieller und alveolarer Lungenmakrophagen bei der Entstehung der Silikose in Ratten. Verlag Görlich & Weiershäuser GmbH, Marburg
- Ames et al.**(1973): An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. (1973) *PNAS, USA* 70: 782-786
- Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie** (1993): Anlage 4 zu den Unfallverhütungsvorschriften, Grenzwerte, Seite 43, Ausgabe Feb. 1993, Jedermann-Verlag, Heidelberg
- Bick, H. und Preuss, J.** (1991): Rüstungsaltslasten: Vorkommen – Erfassung – Sanierung Dargestellt am Beispiel der ehemaligen Allendorfer Sprengstoffbetriebe in Hessen. *EntsorgungsPraxis* 4/91 S.144-149
- Biomedica GmbH** (1994): Anleitungsheft zum nichtradioaktiven Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest BI-5000, Seite 8
- Boyum, A.** (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin Lab Invest Suppl*, 97: 77-89
- Breitung, J., Bruns-Nagel, D., von Löw, E., Steinbach, K., Kaminski, L., Haas, R. und Gemsa, D.** (1995): Mikrobielle Sanierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden. – *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 7 (4): 195-200
- Bruns-Nagel, D.** (1993): Toxikologische Daten und Fakten zu den Sprengstoffen 2,4,6-Trinitrotoluol und Hexogen (1982-1993), Literature Review for the Industrieanlagen-

Betriebsgesellschaft mbH, Ottobrunn, Germany 1993 (unveröffentlicht)

**Bruns-Nagel, D.** (1997): Untersuchung zur mikrobiologischen Bodensanierung der ehemaligen 2,4,6-Trinitrotoluol Fabrik „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld. Dissertation vom Fachbereich Biologie der Carl von Ossietzky – Universität Oldenburg 1997

**Bruns-Nagel, D., Breitung J., von Löw, E., Steinbach, K., Gorontzy, T., Kahl, M., Blotevogel, K.-H. und Gemsa, D.** (1996): Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in aerobic soil columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2651-2656.

**Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., Steinbach, K., Schmidt, T.C., von Löw, E., Gorontzy, T., Blotevogel, K.-H., Gemsa D.** (1998): Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1676-1679

**Bruns-Nagel, D., Scheffer, S., Casper, B., Garn, H., Drzyzga, O., von Löw, E., Gemsa D.** (1999): Effect of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites on human monocytes. *Enviro. Sci. Technol.*, 33 (15), 2566-2570

**Dieter, H. H.** 1994: Kriterien und Konzentrationsvorschläge zur gesundheitlichen Bewertung von 35 sprengstofftypischen Verbindungen und Abbauprodukten in Böden und Trinkwasser, WaBoLu Heft 7/1994, Berlin

**Drzyzga, O., Bruns-Nagel, D., Gorontzy, T., Blotevogel, K.-H., von Löw, E.** (1999): Anaerobic incorporation of the radiolabeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated soil after different treatment procedures - *Chemosphere* 38(9), 2081-2095

**Drzyzga, O., Gorontzy, T., Schmidt, A., Blotevogel, K. H.** 1994: Toxicity of explosives and related compounds to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 229-235

**EZ4U-Test, Produktinformation:** Nichtradioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest, Biomedica, BI-5000, Wien

**Figdor, C. G., Leemanns, J. m. m., Bont, W. S. DeVries, J. E.** (1983) : Theory and practise of centrifugal elutriation (CE). *Cell Biophyscs.* 5: 105-118

**Gemsa, D., Kalden, J. R., Resch, K.** (1997): Immunologie 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

**Görge, E., Brandt S., Werner D.** (1994): Aufnahme von 2,4,6-Trinitrotoluol in Pflanzen – Freilandversuche auf dem Gelände einer ehemaligen Sprengstofffabrik in Stadthallendorf.

UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox, August 1994

**Grabske, R.J.** (1978): Separating cell populations by elutriation. Fractions No.1, 1-8

**Haas, R.** (1992): Konzepte zur Untersuchung von Rüstungsmittelaltlasten. Dissertation dem Fachbereich Chemie der Philipps-Universität-Marburg 1992

**Haas, R., Schreiber, I., Stork G.** (1990): Rüstungsalftlasten – Erfassung, Erkundung und Bewertung am Beispiel der ehemaligen TNT-Fabrik „Werk Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld. UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox, 2 (3) 139-141 (1990)

**Haas, R., von Löw, E.** (1986): Grundwasserbelastung durch eine Altlast. Die Folgen einer ehemaligen Sprengstoffproduktion für die heutige Trinkwassergewinnung. Forum Städte-Hygiene 37 (1986), 33-43

**Henschler, D.** (1988) Gesundheitsgefährliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, Loseblattsammlung DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH Verlag Weinheim, 1988

**Honeycutt, M. E., Jarvis, A. S., McFarland, V. A.** 1996: Cytotoxicity and Mutagenicity of 2,4,6-Trinitrotoluene and Its Metabolites. Ecotoxicology and Environmental Safety 35, 282-287 (1996)

**Junqueira, L. C. und Carneiro, J.** (1986): Histologie 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin

**Kaufmann, A.** (1998): Differentielle Induktion der Chemokin- und Zytokinsynthese und funktionelle Veränderungen der Chemokinrezeptorexpression in humanen Monozyten und Makrophagen durch bakterielle Moduline, Influenza A-Virus und Virosomen. Dissertation im Fachgebiet der Theoretischen Medizin (Humanbiologie) der Philipps-Universität-Marburg.

**Koss, G., Lommel, I., Ollroge, I. Tesseraux, Haas, R. und Kappos, D.** 1989 : Zur Toxikologie der Nitrotoluole und weiterer Nitroaromaten aus rüstungsbedingten Altlasten. Bundesgesundheitsblatt 32 (1989), 527 - 536

**Kraß, J. D.** (1998): 2,4,6-Trinitrotoluol und relevante Metaboliten: Untersuchungen zu chemischen Eigenschaften und biologischen Wirkungen unter besonderer Berücksichtigung des Mediums Boden. Wissenschaft und Technik Verlag, Berlin.

**Kumagai, Y., Wakayama T., Lib S., Shinohara A., Iwamatsu A., Sun G., Shimojo N.** (2000): Zeta-crystallin catalyzes the reductive activation of 2,4,6-trinitrotoluene to generate reactive oxygen species: a proposed mechanism for the induction of cataracts. FEBS Lett. 2000 Aug 4; 478 (3): 295-8

**Lapsystems** (1993): Luminoskan Applications. The Chemiluminescence Measurement of Reactive Oxygen Intermediates Produces by Activated Leukocytes. Application Bulletin No.1, 1993, Laboratory Systems Division, Finland.

**Layton, D., Mallon, B., Mitechel, W., Hall, L., Fish, R., Perry, L., Snyder, G., Bogen, K., Malloch, W., Ham, C., Dowd, P.** Conventional weapons demiliarization: A health and environmental effects data base assessment. Explosives and their co-contaminants. Final Report, Phase II, U.S. Army Medical Research and Development Command Fort Detrick, Maryland, USA, Dezember 1987, UCRL-21109

**Lilius, E.-M. und Waris M.** (1984): A very sensitive and rapid chemiluminescence method for the measurement of phagocytosis. In: Analytical Applications of Bioluminescence Chemiluminescence.

**Lui Y.Y., Yao, M., Fang, J.-L., Wang, Y.-W.** 1995: Monitoring human risk and exposure to trinitrotoluene (TNT) using haemoglobin adducts as biomarkers. Toxicology Letters 77 (1995) 281-287

**Lui, H. X., Qin, W. H., Wang, G. R., Yang Z.Z., Chang, Y. X., Jiang, Q. G.** 1995 : Some altered concentrations of elements in semen of workers exposed to trinitrotoluene. Occupational and Environmental Medicine 1995; 52: 842-845

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996; S. 334

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996; S. 334-342

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996; S. 338-339

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996; S. 595

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996; S. 695

**Martinetz, D. und Rippen, G.** 1996: Handbuch der Rüstungsaltslasten, ecomed 1996; S. 696

**McKone, T.E., Daniels, J.I.** 1991: Estimating human exposure through multiple pathways from air, water, and soil. Regul. Toxicol. Pharmacol. 1991, Feb; 13 (1), 36-61

**Mosmann, T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65, 55-63.

**Neumann, H. G.** 1989: Toxikologische Bewertung der kontaminierten Böden aus dem Be-

reich der ehemaligen Sprengstoffbetriebe in Stadtallendorf, Gutachten für Bick, H. in Gießen, Aktenzeichen: 39a-79n 08.03

**Neumann, H.-G.** 1996: Toxic Equivalence Factors, Problems and Limitations. Food and Chemical Toxicology 34 (1996) 1045-1051

**Preuss J., Haas R.** (1987): Die Standorte der Pulver-, Sprengstoff-, Kampf- und Nebelstofffabriken im ehemaligen Deutschen Reich. Geografische Rundschau 39 (1987), 578-584

**Preuss, J., Haas, R., Koss, G.** 1988 : Altstandorte – Altablagerungen - Altlasten. Das Beispiel eines ehemaligen Standortes der chemischen Rüstungsindustrie. Geografische Rundschau 40 (1988), S. 31-37

**Roche Lexikon Medizin** Version 3.5, Stichwort Monozyt/ Makrophage. Urban & Schwarzenberg-Verlag

**Tan, E., Ho, C.H., Griest, W. H., Tyndall, R. L.** (1992): Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. J. Toxicol. Environ. Health, 36: 165-175, 1992

**Thierfelder, W. und Noel Masihi, K.** (1995): Effects of Trinitrotoluene (TNT) Metabolites on Chemiluminescenc Response of Phagocytic Cells. Int. J. Immunopharmac., Vol 17, No. 5 pp.453-456, 1995

**Toni Lindl und Jörg Bauer:** Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 2.überarbeitete und erweiterte Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1989

**van Furth, R.** (1982): Current view on the mononuclear phagocyte system. Immunobiology, 161, 178-185

**von Knopp, L.** 1996: Rüstungsaltslasten aus rechtlicher Sicht, aus: Handbuch der Rüstungsaltslasten/ D. Martinetz/ G. Rippen, ecomed 1996

**Walker, J. E. and Kaplan, D. L.** (1992): Biological degradation of explosives and chemical agents. Biodegradation 3: 369-385

**Wolff, H. J.** 1998: Prüf- und Eingreifwerte für die Beurteilung einer Boden/ Grundwasserkontamination mit spengstofftypischen Schadstoffen. Weiterbildungsseminar der Johannes Gutenberg-Universität Mainz am 4.- 6. März 1998

**Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. Riethmuller, G.** (1988): Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. Int J Cancer, 41, 456-461.

**Liste eigener Veröffentlichungen:**

Bruns-Nagel, D., **Scheffer, S.**, Casper, B., Garn, H., Drzyzga, O., von Löw, E., Gamsa D.  
(1999): Effect of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites on human monocytes. – Enviro. Sci.  
Technol., 33 (15), 2566-2570

**Scheffer, S.**, Bruns-Nagel, D., Casper, B., Garn, H., Drzyzga, O., von Löw, E., Gamsa D.  
(Postervortrag) Introduction of an immunological test-system with human-monocytes as test  
cells. 9<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC-Europe May 1999.

**R.S., Scheffer, T.** Richter, K. Schlote, M.P. Manns, and T. Greten: Apoptotic tumor cells  
induce a protective tumor immune response in vivo. Immunobiology 204: S.304 Number 1-2,  
Sep 2001 (Abstract)

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Beato, Doss, Fruhstorfer, Gemsa, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Happle, Hartmann, Havemann, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Kern, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Kummer, Kuni, Kuschinsky, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mannheim, Mennel, Netter, Neumann, Neurath, Niessing, Oepen, Pfab, Radsak, Rager, Remschmidt, Richter, Riedmüller, Rieger, Rothmund, Schachtschabel, Schmitt, Schmitz-Moormann, Schüffel, Schulz, Schwarz, Schwerk, Seitz, Seyberth, Siegrist, Slenczka, Stempel, Thomas, Unsicker, Wagner, v. Löw, v. Wichert



## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Gemsa, der mir die Promotion in der Immunologie und Umwelthygiene ermöglichte, möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Das große Vertrauen, ein methodisches Neuland zu erarbeiten, hat mir viel wertvolles Handwerkszeug mit auf den forschenden Weg gegeben. Einen ganz anderen Weg hat Herr Prof. Gemsa durch die zwei hervorragenden Seminar-Fahrten ins Klein-Walser Tal hinterlassen. Wandern und Trekking gehört seitdem zu meinen großen Leidenschaften.

Vielen Dank an Dr. Christof Hasse, ein Computerproblem ist keines mehr gewesen, wenn Christof sich diesem annahm.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Eberhard von Löw und Dr. Dirk Bruns-Nagel für das große Verständnis und die Bereitschaft bedanken, einem Humanmediziner ein praktisches Grundhandwerkszeug der Umwelthygiene und Chemie zur vermitteln. Es war immer ein Vergnügen in der Umwelthygiene zu sein. In der großen entscheidenden Phase war Dr. Holger Garn immer mit sehr viel Erfahrung und tollen Tipps zur Stelle. Vielen Dank auch an Bärbel Casper, die mir sehr bei der Durchführung der Chemilumineszenzmessung geholfen hat.

Vielen Dank an Dr. Andreas Kaufmann, denn wie man Monozyten ganz ganz vorsichtig aus dem Blut in hoher Reinheit gewinnt, versteht er wie kein Zweiter.

Vielen Dank an all meine Freunde in Marburg, es war eine tolle Zeit, und ich erinnere mich sehr gerne daran.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben und mich in jeder Phase der Doktorarbeit sehr unterstützt haben.

Liebste Sitta, Dir möchte ich besonders danken für Deine Geduld, herzliche Unterstützung und große Liebe in jeder Lage.